

2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

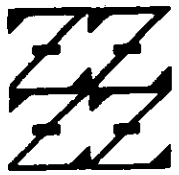
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACION DE SEXOGENETICO POR MEDIO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**CARLOS DIAZ RODRIGUEZ**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUBIERO EN  
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1999

277960

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DETERMINACIÓN DE SEXO GENÉTICO POR MEDIO DE LA  
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

---

**Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Genética Forense de la Dirección General de Servicios Periciales de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal.**

**AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

**DR. PEDRO ESTRADA**

**DIRECTOR GENERAL DE SERVICIOS PERICIALES DE LA  
PROCURADURIA GENERAL DE LA JUSTICIA DEL DISTRITO FEDERAL**

**Por todo el apoyo recibido durante el tiempo de realización de este trabajo.**

**BIOL. CARLOS CARRIEDO**

**SUBDIRECTOR DE SERVICIOS PERICIALES DE LA P . G . J . D . F.**

**Por el facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de investigación.**

**La asesoría estuvo a cargo de:**

**M en C. Alfonso Luna Vásquez**

**Q.F.B. Gloria Vilchis Dorantes**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Dedico de manera especial este trabajo de Tesis a mis Padres: Carlos y  
Consuelo**

**A quienes les debo todo lo que soy:  
Individualidad Genética y Espiritual**

**A mis Abuelos: Florentino y Josefina  
Por soportarme por tanto tiempo y por ese amor tan “especial”**

**A mis Hermanos: Gerardo, Edgar y Joseline  
Quienes siempre me apoyaron con su gran amor y compañía a toda prueba.**

**A mi tía Marta: Por todo lo que representa en mi vida.**

**A mis tíos: Mariaelena, Jaime, Jorge  
Por Confiar e impulsarme siempre.**

**A Irene Sanz:  
Con todo mi amor, por el apoyo incondicional  
En los buenos y malos momentos de mi vida.**

**A Gaby y Tere  
Por su amistad y el apoyo recibido en todo momento  
Y por compartir sus conocimientos de manera desinteresada.**

**A mis compañeros del Laboratorio de Genética Forense:  
Lourdes VegaArturo, Raúl, Marco, Manuel, Violeta, Elena, Rayo, Maru, Jorge  
Porque más que compañeros y amigos fueron maestros para mí.**

**A mis amigos de la Universidad:  
Arturo, George, Lavara, Hugo, Nancy, Rosalba, Jorge Alvaro, Cobi  
Por todos esos momentos compartidos.**

# INDICE

| TEMA   | PÁGINA |
|--|--------|
| RESUMEN  | 6      |
| FUNDAMENTACIÓN TEORICA   | 7      |
| INTRODUCCIÓN   | 15     |
| CAPITULO 1 CONCEPTOS BASICOS                                       | 17     |
| 1.1. Estructura y función del material genético                    | 18     |
| 1.2. Composición química   | 21     |
| 1.3. ADN repetitivo  | 22     |
| 1.4. Duplicación del ADN   | 23     |
| 1.5. Los genes como elementos de herencia                          | 24     |
| 1.6. Los cromosomas  | 24     |
| 1.7. La individualización genética del ser humano                  | 26     |
| CAPITULO 2 MARCADORES GENETICOS                                    | 29     |
| 2.1. Marcadores proteicos  | 29     |
| 2.2. Marcadores de ADN   | 29     |
| 2.3. Tipificación del ADN con propósitos de identificación         | 30     |
| 2.3.1. Aplicación de la PCR en la individualización                | 31     |
| 2.4. Marcadores genéticos utilizados en el área legal y forense    | 31     |
| CAPITULO 3 DETERMINANTES DEL SEXO                                  | 33     |
| 3.1. Patrones  | 33     |
| 3.2. Cromosomas sexuales   | 33     |
| 3.3. El sistema XY   | 33     |
| 3.4. Determinación del sexo en el humano                           | 34     |
| CAPITULO 4 PRINCIPIOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN<br>USANDO PCR     | 37     |
| 4.1. La reacción en cadena de la polimerasa                        | 38     |
| 4.1.1. El proceso de la PCR  | 38     |
| 4.2. Propiedades de la ADN polimerasa                              | 39     |
| 4.3. Variables que afectan la amplificación                        | 39     |
| 4.4. Diseño y preparación de los cebadores de amplificación de PCR | 42     |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.1. Calidad de los cebadores sintetizados  | 42        |
| 4.5. Manejo y almacenaje de los cebadores   | 42        |
| 4.5.1. Elección de los iniciadores y secuencias blanco de ADN                       | 43        |
| 4.5.2. La secuencia molde o blanco a amplificarse tiene las siguientes indicaciones | 44        |
| 4.6. Optimización de la reacción de amplificación en PCR                            | 45        |
| 4.7. Pasos en la optimización de una reacción de PCR                                | 47        |
| 4.7.1. Optimización de la concentración del ión Magnesio                            | 47        |
| 4.7.2. Diseño de la mezcla de reacción  | 47        |
| 4.8. Elección de las condiciones de reacción  | 48        |
| 4.8.1. Desnaturalización  | 48        |
| 4.8.2. Alineación   | 49        |
| 4.8.3. Extensión  | 49        |
| 4.9. Problemas en PCR   | 49        |
| <br>  |           |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>   | <b>53</b> |
| <br>  |           |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>55</b> |
| <br>  |           |
| <b>HIPOTESIS</b>  | <b>56</b> |
| <br>  |           |
| <b>DIAGRAMA DE FLUJO</b>  | <b>57</b> |
| <br>  |           |
| <b>MATERIAL Y METODOS</b>   | <b>58</b> |
| <br>  |           |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>62</b> |
| <br>  |           |
| <b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>  | <b>76</b> |
| <br>  |           |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>80</b> |
| <br>  |           |
| <b>PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES</b>   | <b>82</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ANEXOS</b>   | <b>83</b> |
| <b>APENDICE</b>   | <b>83</b> |
| <b>A. Materiales, equipos y reactivos</b>                           | <b>83</b> |
| <b>B. Procedimientos para la extracción de ADN y electroforesis</b> | <b>86</b> |
| <b>C. Preparación de reacción de PCR</b>                            | <b>91</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>                                   | <b>94</b> |



## **Resumen**

**La capacidad de determinar el "sexo" de muestras cuyo origen sexual se desconoce, es una evidencia valiosa en el área forense.**

**La determinación genética del sexo, se realizó por amplificación (PCR) de la familia satélite alfoide, de acuerdo al método descrito por Witt y Erickson, el cual amplifica secuencias específicas alfoideas del cromosoma X-(130pb) y Y-(170pb) para individuos masculinos y solo una secuencia específica del cromosoma X-(130pb) en individuos femeninos. Se optimizaron también las condiciones iniciales de la reacción con el propósito de implementarla a las condiciones del laboratorio de genética forense, en las cuales el ADN recuperado por extracción, se encuentra limitado en cantidad y calidad debido a las condiciones en las que se recuperan las muestras de tipo forense.**

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

Una función primaria de la biología forense es el establecer asociación entre las evidencias biológicas y el individuo del cual se deriva. Esto involucra generalmente el análisis de rasgos que a priori son conocidos para discriminar entre individuos. (1,5,9,13) Por muchos años los científicos forenses se han valido de pruebas serológicas para analizar fluidos corporales. Estas pruebas discriminatorias se basan en determinar y encontrar diferencias en proteínas, actividades enzimáticas o marcadores inmunológicos. (5,13)

Esta variabilidad de rasgos, se sabe ahora que son codificados por el ácido desoxirribonucleico (ADN), el análisis directo de ADN representa una innovación lógica consecuente de los métodos serológicos convencionales.

Con excepción de gemelos monocigóticos, el ADN de cada individuo es único, y para cada individuo el ADN de cada una de sus células es idéntico. De esta manera el ADN genómico de un individuo se puede extraer de una gran variedad de fuentes biológicas como la sangre, semen, saliva, pelo y virtualmente cualquier tejido corporal, fluido ó secreciones que contengan células nucleadas. (13)

Para la identificación forense es necesario que el substrato biológico de prueba este relativamente estable. El ADN es una molécula muy estable que puede mantenerse inalterada por muchos años a pesar de las condiciones ambientales que en la mayoría de las veces en muestras forenses es totalmente adverso (Tabla 1). Sumado a esto muchos de los métodos empleados actualmente para la identificación forense por ADN requieren solamente de un pequeño número de células.

**TABLA 1.0**

**FACTORES AMBIENTALES QUE DAÑAN AL ADN**

| <b>Factor Ambiental</b>  | <i>Possible Daño al ADN</i> | <b>Comentario</b>   |
|--------------------------|-----------------------------|---|
| Contaminación Microbiana | Ruptura de la hebra         | El crecimiento microbiano requiere condiciones de calor y temperatura; la ruptura de la hebra es consecuencia de la liberación de nucleasas de los microbios. |
| Luz                      | Modificación de bases,      | Resulta de la exposición a  |

|                     |  |   |
|---------------------|--|---|
| Agentes Oxidantes   | Entrecruzamiento entre la hebra y proteínas<br>Modificación de bases.<br>Ruptura de la hebra | longitudes cortas UV  |
| Solventes Orgánicos | Generalmente no afectan  | Tómese en cuenta que la mayoría de las extracciones de ADN, incluyen la exposición con fenol, cloroformo y alcoholes. |
| Acidos              | Modificación de bases<br>Ruptura de la hebra<br>Despurinación                                | Para provocar el daño se requiere de ácidos fuertes y/o elevadas temperaturas.  |
| Bases               | Disociación de la hebra,<br>Ruptura de la hebra  | Para provocar el daño se requiere de bases fuertes (pH>12)  |
| Temperatura         | Bajas-No afecta<br>Alta-disociación de la hebra  | Daño espontaneo<br>El daño se incrementa con la temperatura   |
| Tiempo              | Modificación espontanea de bases, ruptura de la hebra, despurinación                         | Menor si se esta en solución y muy bajo en estado seco.   |

Por estas características la molécula de ADN es la más importante instancia para determinar el origen de cualquier espécimen biológico.

### **APLICACIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), EN ANÁLISIS GENÉTICOS**

El intercambio de sustancias biológicas entre individuos durante un hecho criminal, a menudo involucra cantidades mínimas de estas sustancias. Estas pequeñas evidencias de fluidos corporales suelen contener ADN genómico, el cual es cualitativamente representativo pero cuantitativamente insuficiente para el análisis de RFLPs. (5,8,9,13) Los VNTRs, surgieron entonces como consecuencia de la imposibilidad de los RFLPs de emplearse en el área forense. El empleo de VNTRs sigue un método que se fundamenta en el estudio de genes que contienen diferente número de secuencias de oligonucleótidos repetidos en Tandem. El otro método RFLP se basa en las variaciones en la longitud de fragmentos de ADN que se presentan en todas las especies que son generadas por endonucleasas específicas. Cada variación es consecuencia de mutaciones que crean o terminan sitios de reconocimientos para estas enzimas específicas. (9)

Las condiciones ambientales y el tiempo que pasa hasta las condiciones de recuperación se ven reflejadas en la capacidad de obtener resultados si se someten estas muestras biológicas al análisis genético por técnicas tradicionales, estas condiciones mencionadas inciden directamente al contenido y calidad del ADN, ya que lo degradan a niveles en el que es inadecuado usar estas metodologías (Tabla 2.0). (9,10,13)

**Tabla 2.0**  
**ADN en Materiales Biológicos.**

| Tipo de muestra                     | Cantidad de ADN |
|-------------------------------------|-----------------|
| Sangre                              | 20-40 µg/ml     |
| Mancha de 1cm <sup>2</sup>          | Aprox 200ng     |
| Mancha de 1mm <sup>2</sup>          | Aprox 2ng       |
| Semen                               | 150-300µg/ml    |
| Hisopado vaginal Pos coito          | 0-3µg           |
| Pelo                                |                 |
| Completo                            | 1-170ng/pelo    |
| Raiz                                | 0-12ng/pelo     |
| Saliva (células bucales)            | 0.5-10/ml       |
| Orina (células del tracto urinario) | 1-20ng/ml       |

Se presenta entonces un problema y para resolverlo deberá existir una técnica que pueda ser aplicada al análisis del ADN aislado de muestras biológicas de origen humano y con la capacidad de analizar fragmentos cortos y específicos del mismo material genético. Este problema ya ha sido resuelto con el desarrollo de una técnica a la que se le ha dado el nombre de reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*). ( Saiki et al. 1985). (13)

La reacción en cadena de la polimerasa. (PCR), es un proceso por el cual segmentos cortos de secuencias específicas de ADN pueden ser selectivamente replicados por millones de veces ó más. El proceso es referido también como clonación *in vitro* o como geneamplificación. (13)

El proceso de PCR fue concebido y desarrollado originalmente por Mullis y colaboradores y publicado en 1985. En ese mismo año se describe la aplicación de la "huella genética" en el análisis de evidencias biológicas. Subsecuentes innovaciones han permitido que el proceso de PCR se automatice y que sea fácil de usar, más conveniente

y menos costoso. Por todas estas características la PCR cada vez gana más aceptación como una herramienta en la Biología Molecular, Genética de Poblaciones, Ciencias Forenses y Diagnósticos Médicos.

En Genética Forense la PCR brinda beneficios para el análisis de evidencias biológicas por encima del estudio simple de RFLP y VNTR. Dentro de los beneficios más importantes se mencionan. :

- La amplificación puede aplicarse a muestras que contienen muy poca cantidad de ADN. (Ej. : pelos, trazas de saliva o colillas de cigarrillos). Esta tipificación de ADN se extiende a las muestras que no pueden ser tipificadas usando RFLPs, grupo sanguíneo o tipificación de proteínas
- La amplificación puede realizarse en muestras que contienen ADN degradado en comparación con los métodos de RFLP que requieren ADN en cantidades cuantitativamente superiores y en óptimo estado de conservación.
- La PCR y la subsecuente tipificación son relativamente rápidas y fáciles de realizar.
- La cantidad mínima de muestra que se ocupa en el estudio hace de la PCR la técnica de elección en el área de Biología Molecular y en especial para el área de genética forense, ya que el estudio se puede repetir para comparar resultados sin que esto signifique una pérdida importante de muestra.

Por todas estas ventajas la PCR emerge sobre otras técnicas, como la tecnología dominante en el análisis forense. (4,5,13)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción bioquímica, en la cual pequeñas cantidades de segmentos específicos de ADN son amplificadas en grandes cantidades de ADN lineal de doble cadena (Mullis, 1990)<sup>(13)</sup>

La PCR tiene la capacidad de generar grandes cantidades de ADN específico a partir de pequeñas cantidades de ADN.

La PCR fue concebida en 1983 por el Dr. Kary Mullis del departamento de Genética Humana. Los primeros experimentos de amplificación por PCR fueron realizados por el Dr. Mullis y el Dr. Fred A. Faloona, este último desarrolló el primer equipo con ciclos de temperatura automatizado, al cual se denomina termociclador de PCR. (Mullis and Faloona, 1987) <sup>(7)</sup>. Mullis y Faloona determinaron las características básicas de la

amplificación experimental usando un par de cebadores específicos para una región del gene de la  $\beta$ -globina de 118 pb. (12)

Mullis et al. (1987) publicó la primera descripción de PCR en el contexto de la biología molecular, esta primera aplicación se desarrolló en una prueba prenatal de anemia falciforme. (12)

## **PRINCIPIOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN USANDO PCR**

La amplificación por PCR es una reacción enzimática que utiliza ADN polimerasa. Las propiedades catalíticas de la ADN polimerasa, incluyen los requerimientos del sustrato (cebadores y ADN molde),  $V_{max}$ . (nucleótidos incorporados por segundo por molécula de enzima), desarrollo (bases agregadas por extensión). Todas las ADN polimerasa catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo terminal 3'-OH de la cadena creciente y el grupo 5'-PO<sub>4</sub> del deoxinucleótido trifosfato (dNTP). Cada dNTP entrante es determinado por el patrón. (1,2,6,10,12)

La amplificación del ADN se efectúa por ciclos repetidos de la reacción en cadena de la polimerasa, cada uno de los cuales tiene tres diferentes temperaturas:

1. - Desnaturalización del ADN patrón o molde a 94° a 96° C.
2. - Alineación de los cebadores al ADN molde 42° a 60 °C
3. - Extensión de los cebadores por la ADN polimerasa de 60° a 72°C.

La reacción de amplificación contiene un par de cebadores arreglados de tal manera que se hibridan a la hebra opuesta de la cadena patrón previamente desnaturalizada y la extensión es orientada hacia el extremo 3'-OH. Con cada extensión del producto se obtiene la secuencia complementaria del otro cebador, y el producto de cada extensión sirve como un patrón en el próximo ciclo de PCR.

En el primer paso del primer ciclo de PCR, el ADN patrón es mezclado con un gran exceso de los dos cebadores de amplificación. La mezcla se desnaturaliza de 94 a 96°. En el segundo paso del primer ciclo, la reacción es llevada a la temperatura óptima en que se alinean los cebadores con la secuencia específica. En el tercer paso, la temperatura se lleva a 72°, la cual está apenas por abajo de la óptima para la Taq ADN pol I, pero no encima de la temperatura en que se alinean los cebadores con la región específica de ADN. Los cebadores se extienden para dar una nueva hebra de ADN de

cada patrón formado, cada uno con un extremo 5' terminal (determinado por la secuencia de los cebadores) y un indefinido 3' terminal. (1,2,7,10,12)

La primera extensión de los cebadores es crítica en la determinación del producto final (Wages y Fowler, 1993). Los primeros ciclos de PCR constituyen una fase de reconocimiento en la que se seleccionan los segmentos específicos de ADN para la amplificación. Durante los ciclos iniciales de la PCR, cada cebador actúa como una sonda, que reconocen todas las secuencias específicas.

En el segundo ciclo de PCR, el gran producto del ciclo inicial se desnaturaliza, y luego se extiende para producir los primeros dos "productos cortos." Estos productos cortos son de ADN de cadena única de longitud discreta cuyos extremos terminales 5' y 3' son definidos por la secuencia del par de cebadores. En el tercer ciclo, se tienen ya cuatro productos de los ciclos anteriores. (1,2,7)

En la investigación de tipo forense, la determinación del sexo en diferentes muestras biológicas de origen humano proveniente de un hecho ilícito, provee una pista importante en la identificación del o los sospechosos, además de ser una prueba irrefutable en la identificación del sexo como principio básico en restos humanos.

Anteriormente, la determinación de sexo se realizaba con métodos morfológicos tales como la visualización de cromatina sexual o por la determinación de hormonas sexuales. En el área forense siempre resulta necesario establecer el origen sexual de una evidencia, es por ello que se cuenta con especialistas del área forense, capaces de determinar el sexo de una evidencia forense, siguiendo metodologías establecidas basadas en características morfo y fisiológicas de las estructuras analizadas, estos peritos son los del área de antropología, odontología, patología, etc.

Recientemente, diversas técnicas relacionadas con la biología molecular proponen el método de *Southern Hybridization* de patrones de ADN específico del cromosoma "Y". La determinación del sexo de una muestra de naturaleza biológica puede ser evaluada en cualquier desarrollo de la investigación, la reacción en cadena de la polimerasa es capaz de amplificar fragmentos específicos de 170 pb para el cromosoma "Y" así como uno de 130 pb para el cromosoma "X" de región pericentromérica, denominada familia alfoide (3,9,14,15) la cual es una familia compleja de ADN repetitivo localizadas en la heterocromatina centromérica de cromosomas humanos. (3,14) La familia alfoide está

compuesta por arreglos en tandem de segmentos de 170 pb. Los segmentos aislados de diferentes cromosomas muestran secuencias homogéneas pero también con diferencias con respecto a bases individuales. Por lo que los 170 pb pueden variar a lo sumo en un 40%. Las repeticiones son organizadas en turnos dentro de grupos que contienen varias unidades en tandem, y estos grupos son posteriormente organizados dentro de grandes secuencias de 1 a 16 Kb de longitud. Estos grandes segmentos son repetidos para generar segmentos que van de 0.5 a 10 miles de pb. Cada repetición de ADN es cromosoma específico.

Estas variaciones en la secuencia de la familia alfoide resulta en una alta frecuencia de RFLPs. Estos se heredan y pueden ser empleados en la caracterización de ADN de individuos específicos. (3)

La determinación de sexo genético por medio de la PCR, se basa en la propiedad única de la familia alfoide de ser cromosoma específico y altamente repetitivo. Cabe mencionar que este tipo de secuencias repetidas constituye el 30 % del genoma humano y la familia alfoide junto con otras “familias satélites”, constituye aproximadamente el 10 % de todo el genoma humano. (3,6,13,14)

La concepción en la implementación de esta técnica en el área forense se remite a las propiedades únicas de estas regiones y a la gran sensibilidad que ofrece esta tecnología con respecto a RFLPs y el análisis simple de VNTRs. (9,13)

El ADN contiene secuencias que identifican el sexo de un organismo y se puede llegar a esta información usando PCR.

Los cromosomas de mamíferos contienen dos tipos de cromosomas sexuales, el “X y el Y”. Las hembras normales contienen dos cromosomas X, mientras que los machos normales tienen un cromosoma X y otro Y. (14) El desarrollo de un embrión masculino está determinado por un cromosoma Y, así el sexo fenotípico de individuos con un complemento anormal de cromosomas sexuales depende únicamente de la presencia o ausencia del cromosoma Y (por ejemplo; un individuo XO es fenotípicamente hembra y un individuo XXY es fenotípicamente macho). Una aplicación objetiva en el área biomédica es la técnica llamada cariotipo, que es útil en la determinación de sexo genético en muestras sanguíneas.



El estudio del ADN se inició para desentrañar las diferencias entre los cromosomas sexuales. El número de secuencias específicas de los cromosomas sexuales que fueron identificadas sirvieron como marcadores potenciales para la identificación de sexo. (14,15) Existen tres técnicas basadas en PCR para la determinación de sexo. La más simple consiste en la amplificación de una secuencia específica de Y donde la presencia de producto indica que la muestra contiene ADN de macho. En esta técnica la ausencia de producto de PCR, *no puede ser interpretada a menos que ésta sea una muestra testigo*, este tipo de ensayo presenta demasiados problemas en la interpretación de resultados ya que al no presentarse productos de amplificación para Y, se creería que la muestra es de hembra cuando en realidad lo que se observa es una inhibición de la reacción para el cromosoma "Y". (3,6,14,15)

Otra técnica usada en pruebas médicas y en muestras forenses es la que emplea un segmento del DYZ1 la cual es una secuencia repetida para un marcador polimórfico de Y, y que utiliza repeticiones ALU o de DQA como testigos de amplificación. (14)

Una mejora en estos métodos es la utilización de los dos cromosomas sexuales en la determinación de sexo. Witt y Erickson describen el método usando regiones que tiene secuencias repetidas de los cromosomas "X" y "Y" las cuales son específicas. Las secuencias que se amplifican emplean dos pares de cebadores, uno para cada cromosoma sexual, para el cromosoma X se emplea el par cuya secuencia que amplifica es X1: AATCATCAAATGGAGATTT; X2: GTTCAGCTCTGTGAGTGAAA, (Waye y Willard 1985.), Y para el cromosoma "Y" son: Y1: ATGATAGAACGGAAATATG; Y2::AGTAGAATGCAAAGGGCTCC, (Wolfe et al 1985). Estas regiones son llamadas satélites alfoideos. La familia alfoidea esta compuesta por arreglos en tandem de segmentos de 170 pb. Estas variaciones en las secuencias resultan en una alta frecuencia de RFLPs. (3)

La interpretación de resultados para este método se verifica con un corrimiento electroforético en geles de agarosa para la observación de bandas de 170 pb para el cromosoma Y, y de 130 para el cromosoma X. De esta manera se verifica el sexo de la muestra de la cual proviene el ADN amplificado.

## **Introducción**

La ciencia de la genética incluye las reglas de la herencia en las células, los individuos y las poblaciones, y los mecanismos moleculares mediante los cuales los genes controlan el crecimiento, el desarrollo y la apariencia de un organismo. Ninguna de las áreas de la biología puede ser apreciada o entendida verdaderamente sin una comprensión de la genética, ya que los genes no sólo controlan los procesos celulares, sino que determinan también el curso de la evolución. La genética es una ciencia básica apasionante cuyos conceptos proporciona el marco para el estudio de la biología moderna.

La genética forense como parte de la biología, cumple con estas premisas por lo que el entendimiento de estos conceptos proporcionan una ayuda invaluable en la resolución de problemas legales en los que se aplica la genética. Una función primaria de la biología forense es el establecer asociación entre las evidencias biológicas y el individuo del cual se deriva. Esto involucra generalmente el análisis de rasgos que a priori son conocidos para discriminar entre individuos. (1,5,9,13) Por muchos años los científicos forenses se han valido de pruebas serológicas para analizar fluidos corporales. Estas pruebas discriminatorias se basan en determinar y encontrar diferencias en proteínas, actividades enzimáticas o marcadores inmunológicos. (5,13)

Con excepción de gemelos monocigóticos, el ADN de cada individuo es único y para cada individuo el ADN de cada una de sus células es idéntico. De esta manera el ADN genómico de un individuo se puede extraer de una gran variedad de fuentes biológicas como la sangre, semen, saliva, pelo y virtualmente cualquier tejido corporal, fluido ó secreciones que contengan células nucleadas. (13)

Para la identificación forense es necesario que el substrato biológico de prueba este relativamente estable. El ADN es una molécula muy estable que puede mantenerse inalterada por muchos años a pesar de las condiciones ambientales que en su mayoría de las veces en muestras forenses es totalmente adverso. Sumado a esto muchos de los métodos empleados actualmente para la identificación forense por ADN requieren solamente de un pequeño número de células.

Por estas características la molécula de ADN es la más importante instancia para determinar el origen de cualquier espécimen biológico.

En la investigación de tipo forense, la determinación de sexo en diferentes muestras biológicas de origen humano proveniente de un hecho ilícito, provee una pista importante en la identificación del o los sospechosos, además de ser una prueba irrefutable en la identificación del sexo como principio básico en restos humanos.

Anteriormente, la determinación de sexo se realizaba con métodos morfológicos tales como la visualización de cromatina sexual o por la determinación de hormonas sexuales, odontogramas en el caso de piezas dentales y explanometría facial y estudios antropométricos de piezas anatómicas corporales realizadas por peritos antropólogos. Sin embargo para estos tipos de estudios es necesario contar con una cantidad apreciable de material biológico, que provean información suficiente para completar una individualización.

Recientemente, diversas técnicas relacionadas con la biología molecular proponen el método de *Southern Hybridization* de patrones de ADN específico del cromosoma "Y". La determinación de sexo de una muestra de naturaleza biológica puede ser evaluada en cualquier desarrollo de la investigación, la reacción en cadena de la polimerasa es capaz de amplificar fragmentos específicos de 170 pb para el cromosoma "Y" así como uno de 130 pb para el cromosoma "X" de región pericentromérica, denominada familia alfoide (3,9,14,15) la cual es una familia compleja de ADN repetitivo localizadas en la heterocromatina centromérica de cromosomas humanos. (3,14) La determinación de sexo genético por medio de la PCR, se basa en la propiedad única de la familia alfoide de ser cromosoma específico y altamente repetitivo. Cabe mencionar que este tipo de secuencias repetidas constituye el 30 % del genoma humano y la familia alfoide junto con otras "familias satélites", constituye aproximadamente el 10 % de todo el genoma humano. (3,6,13,14)

La concepción en la implementación de esta técnica en el área forense se remite a las propiedades únicas de estas regiones y a la gran sensibilidad que ofrece esta tecnología con respecto a RFLPs y el análisis simple de VNTRs. (9,13)

El ADN contiene secuencias que identifican el sexo de un organismo y se puede llegar a esta información usando PCR.

## Capítulo I.

### ANTECEDENTES

El ADN contiene la información genética para la construcción de todas o varias células tejidos y órganos que conforman a un organismo través de toda su vida y también provee la información para hacerlo un individuo único<sup>(5)</sup>.

Se ha tratado de determinar la secuencia completa del genoma humano, entendiendo por genoma en su *aspecto genético* a todos los genes existentes en la dotación cromosómica. Se conoce ya el número de genes existentes en el genoma de algunos procariontes. Para otros organismos los valores aproximados que se dan muestran una gran variación. Así, los referentes al genoma de la bacteria *E. coli* oscilan entre 2000 y 5000 genes. Para *Drosophila melanogaster* se dan 80000 y para el *ratón doméstico* unos cinco millones. No obstante, no se trata de genes estructuralmente funcionales. Lo que se hace más bien es deducir a partir de la cantidad de ADN del núcleo celular el número de pares de nucleótidos y de ello el número de unidades genéticas teóricamente posibles, Independientemente de que se trate de genes funcionales<sup>(5,6,7)</sup>. Los cálculos para el humano se estima entre  $3,5 \times 10^5$  y  $3,3 \times 10^6$ . El ADN del genoma humano se compone de  $3-4 \times 10^9$  pares de nucleótidos, lo cual corresponde a un material lineal de mas de un metro de largo. La información genética almacenada en el ADN es suficiente para la codificación de 7-11 millones de cadenas polipeptídicas, las cuales dirigen el crecimiento y desarrollo de una célula germinal (Zigoto), fertilizada, dentro de un organismo multicelular conocido como *Homo sapiens*<sup>(6,7)</sup>.

Es necesario describir algunos conceptos que se usarán constantemente a lo largo de este trabajo, primeramente se define de manera sencilla la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) y su proceso de duplicación. La forma helicoidal doble del ADN y el apareamiento de las bases permiten comprender la forma de como se transmite la información genética de una generación a la siguiente.

La complementariedad de las bases: Adenina-Timina y Guanina-Citosina, conjugan propiedades que permiten comprender y aplicar las técnicas de la Biología molecular, tal es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés

de *Polymerase Chain Reaction*), que se describe en el capítulo 4, y la cual actualmente es una herramienta muy importante en el área forense ya que por medio de esta técnica se pueden trabajar evidencias biológicas degradadas y que se encuentran en mínima cantidad.

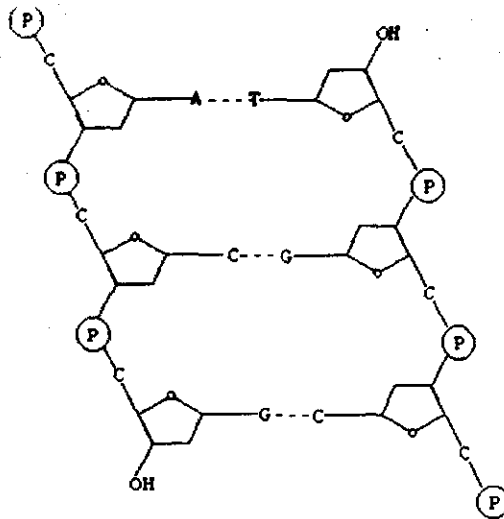
Otros términos que también se definen brevemente son los de gene, cromosoma, fenotipo, genotipo, homocigoto, heterocigoto, sexo genético, satélites, región alfoidea, entre otros. La comprensión de la terminología que se define en este capítulo servirá para entender la utilidad y el contexto de este trabajo.

También se explica brevemente, como es que la segregación cromosómica independiente, la recombinación genética y la mutación, son mecanismos por los cuales se determina que el patrimonio genético sea exclusivo y único en cada ser humano. Por tal razón se puede realizar la caracterización mediante el estudio de marcadores genéticos, estableciendo de esta manera el parentesco entre individuos o bien su identificación y en este caso especial la identificación del sexo genético del individuo.

### **1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO**

Cada una de las subunidades nucleotídicas de ADN consiste de una pentosa en la forma  $\beta$ -furanosa, un grupo de ácido fosfórico y una base nitrogenada.

Las subunidades nucleotídicas empleadas en la construcción de ADN son conocidas como desoxirribunucleósidos 5'-trifosfato y se representan como dATP, dGTP, dCTP, y dTTP. Análogamente los nucleótidos de ARN son llamados ribonucleosidos 5'-trifosfatos y se representan como ATP, GTP, CTP; y UTP<sub>(5,6,7)</sub>.

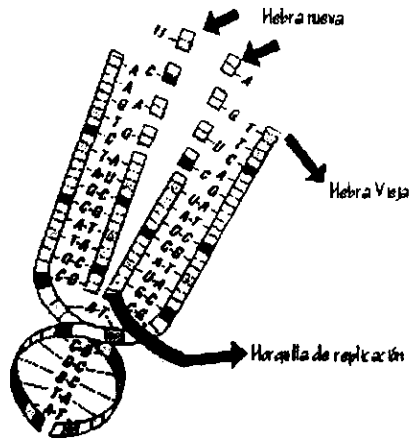


**FIGURA 1.0.** Aspecto detallado de la doble hélice del ADN, que muestra el esqueleto de unidades azúcar fosfato y los escalones formados por pares de bases. Los grupos fosfatos se presentan mediante una "P" encerrada en un círculo, el anillo pentagonal que contiene un átomo de oxígeno es el azúcar desoxirribosa. Las bases pueden ser timina, citosina o guanina (A, T, C, G).

El ácido desoxirribonucleico (ADN), es la molécula fundamental del material genético, está constituido por unidades monoméricas llamadas nucleótidos, cada uno de los cuales está constituido por una base púrica: Adenina (A) o Guanina (G) o bien por una base pirimidica: Timina (T) o Citosina (C), la pentosa desoxirribosa y una molécula de ácido fosfórico<sup>(6,7)</sup>. (En la figura se muestran los cuatro nucleótidos.).

Watson y Crick postularon una estructura del ADN, partiendo de los resultados obtenidos por rayos X de ADN altamente purificado y de las equivalencias entre las bases demostrada por Chargaff. Esta estructura explica como fluye la información genética a través de la molécula.

El ADN consta de dos cadenas paralelas (Figura 2.) dispuestas en doble hélice, con las bases complementarias A-T y G-C apareadas por enlaces de hidrógeno y situadas en el interior de la hélice, mientras que el esqueleto covalente reside en el exterior con las uniones de un grupo fosfato y el azúcar desoxirribosa.<sup>(6)</sup>

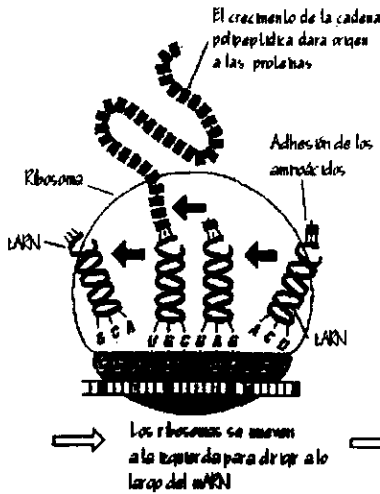


**Figura.2**

*La doble hélice de ADN se desenrolla durante la replicación. Cada cadena actúa como molde para una nueva doble hélice.*

Debido a las reglas de complementariedad, cada nueva doble hélice será idéntica a la original. Además, las dos nuevas dobles hélices serán idénticas entre sí. Así, un par de bases AT en la doble hélice original de ADN dará lugar a dos pares de bases AT, cada uno de ellos en una molécula hija.

El ADN difiere en todos los organismos en la secuencia y cantidad de los nucleótidos que lo forman. La secuencia variable de las cuatro bases a lo largo de la cadena de ADN es la base de la información genética, y son posibles variaciones casi infinitas, ya que cada una de las células humanas, tiene cerca de 3, 000 millones de nucleótidos. El ADN contiene el programa genético para la construcción de todas o varias células tejidos y órganos que conforman a un organismo a través de toda su vida y también provee la información para hacerlo un individuo único.<sup>(1,5,7)</sup>



**Figura 3.0**

La transcripción es el proceso por el cual se sintetiza RNA utilizando como molde la complementariedad de las bases del ADN. El enzima responsable es la ARN polimerasa. La doble hélice de ADN se desenrolla parcialmente durante el proceso, lo que permite a las bases de una cadena actuar como molde para la síntesis del ARN, utilizando las reglas de complementariedad ADN:RNA: A, T, G, y C del ADN se emparejan con U, A, C, y G del ARN. La secuencia de bases del ARN es idéntica a la secuencia que se formaría si el ADN se estuviera replicando, con la salvedad de que el ARN posee uracilo en lugar de timina.

## 1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), consiste de subunidades conocidas como nucleótidos. Químicamente, el ADN consiste de ácido fosfórico, D-2-desoxirribosa ( $\beta$ -D-2'-desoxirribofuranosa) y 4 bases nitrogenadas, llamadas purinas - Adenina (6-aminopurina) y Guanina (2-amino-6-oxipurina)- y las pirimidinas, Citosina (2-oxi-4-amino-pirimidina) y Timina (5-metil-2,4-deoxipirimidina) (Figura 2). La molécula de ARN consiste de ácido fosfórico, D-ribosa y las mismas cuatro bases con excepción de la Timina la cual es reemplazada por la uracil pirimidina (2,4-deoxipirimidina) (Figura 3). En las moléculas de ADN y ARN las bases se abrevian como A, G, C, T y A, G, C, U, respectivamente<sup>(5,6,7)</sup>. Ocasionalmente pueden encontrarse bases inusuales en la molécula de ADN. Estas bases resultan de la derivación de bases normales por cualquiera de las dos reacciones de metilación o glicosilación, dependiendo del tipo del ADN. Estas modificaciones son empleadas para proveer señales de reconocimiento específicas para las enzimas de restricción; las cuales son capaces de incrustarse a las subunidades nucleotídicas adyacentes de manera covalente.

Cada una de las subunidades nucleotídicas de ADN consiste de una pentosa en la forma  $\beta$ -furanosa, un grupo de ácido fosfórico y una base nitrogenada.



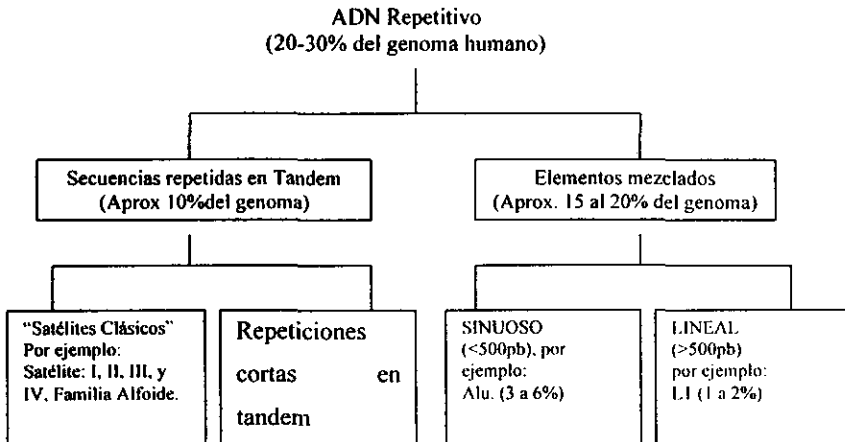
Las subunidades nucleotídicas empleadas en la construcción de ADN son conocidas como desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato y se representan como dATP, dGTP, dCTP, y dTTP. Análogamente los nucleótidos de ARN son llamados ribonucleósidos 5'-trifosfatos y se representan como ATP, GTP, CTP; y UTP.

### 1.3 ADN REPETITIVO.

En los eucariotes, de acuerdo a la composición de bases existen tres clases de ADN el cual se puede clasificar como:

1. De secuencia única, comprende aproximadamente el 70 por ciento del genoma y consiste de segmentos no repetitivos o segmentos que se repiten pocas veces,
2. Secuencias moderadamente repetitivas, comprenden aproximadamente el 20 por ciento del genoma y consiste de segmentos que se repiten unas 1,000 veces y.
3. ADN altamente repetitivo (algunas veces llamado satélites ADN). comprende aproximadamente el 10 por ciento del genoma y consiste de millones de copias de secuencias cortas (menos de 10 pares de bases). Localizadas en regiones de número limitado a través del genoma humano (Ver Tabla 3.0)

**TABLA 3**  
**ADN REPETITIVO EN EL GENOMA HUMANO.**



Cuando una secuencia de bases se repite muchas veces y se acomodan en "Grupos", se dice que es una repetición en "tandem". En el genoma humano existen 4 clases de secuencias repetidas en "tandem". Estas son los Satélites I, II, III, y IV. Los cuales comprenden el 5 por ciento del genoma completo. Además, el genoma humano contiene la clase alfoide de ADN repetitivo el cual se asocia con las regiones centroméricas de ciertos cromosomas. El satélite alfoide consiste de unidades repetidas en Tandem, teniendo secuencias consistentes de aproximadamente 170 nucleótidos.

Las secuencias únicas de ADN representan regiones codificantes (genes), éstas llevan la información para la síntesis de proteínas específicas. Este ADN también determina el grado de la expresión del gene durante toda la vida del individuo, en diferentes tejidos. En el ADN repetitivo, las unidades repetitivas están presentes en arreglos en *tandem* y se localizan comúnmente en las regiones centroméricas de los cromosomas, pero pueden encontrarse también en los telómeros (96-98). Las secuencias repetitivas son formas de ADN no codificante. Debido a esto, este ADN no tiene función conocida, por lo que se le refiere como ADN "chatarra".

#### 1.4 DUPLICACIÓN DEL ADN

El material genético debe hacer réplicas de sí mismo con precisión para que cada célula reciba una copia exacta. También se necesita una cierta **mutabilidad**, o capacidad de cambiar, porque sabemos que el material genético ha cambiado, o evolucionado, a lo largo de la historia de la vida.

El modelo de la doble hélice de Watson y Crick el cual se considera el descubrimiento más importante de este siglo, no sólo explica muchas de las observaciones sobre las propiedades físicas y químicas del ADN, sino que también indica un mecanismo por medio del cual la información genética podía replicarse con exactitud.

El material hereditario tiene que reproducirse de tal manera que la información se transmita exactamente de una generación a la siguiente. Cuando la célula se divide, las cadenas de ADN se duplican y después la doble hélice se abre en dos (Figura 2). La ADN polimerasa sintetiza todos los nucleótidos constituyentes del ADN, a expensas del aporte necesario de desoxirribosa, de fosfato y de las bases A, T, C, y G. Los nucleótidos entran en contacto con las dos bandas de ADN que se han separado. Cuando

un nucleótido de timina se encuentra con una adenina perteneciente a uno de los filamentos progenitores, se establece el enlace de hidrógeno característico, repitiéndose el proceso hasta que todas las bases de las dos bandas abiertas del ADN se hayan enfrentado con sus nucleótidos complementarios A-T y G-C. En este instante habrá cuatro cadenas de ADN, las dos originales y sus dos nuevas bandas complementarias.

(6.7)

### **1.5 LOS GENES COMO ELEMENTOS DE HERENCIA.**

Los genes pueden definirse, para fines prácticos, como las unidades de transmisión hereditarias, y toda característica genéticamente determinada depende de la acción de cuando menos un par de genes homólogos. Se estima que en la especie humana habría alrededor de 50-100,000 genes. Cuando ambos alelos son iguales entre sí se dicen que el individuo es **homocigótico** con respecto a ese par génico. Si no son idénticos se tiene una herencia mixta, **heterocigótico**. Los individuos homocigóticos transmiten de generación en generación el carácter controlado por el par génico. Por el contrario los individuos heterocigóticos se escinden en su descendencia. Cuando sólo se expresa la acción de uno de los alelos, se dice que es dominante sobre el otro, el que por definición se le conoce como recesivo; los genes recesivos sólo se pueden expresar en estado de homocigocidad, pero cuando ambos genes se expresan, se dice que son codominantes<sup>(6)</sup>. Dos términos empleados con frecuencia son genotipo y fenotipo. El genotipo es la estructura genética del individuo y el fenotipo es la expresión reconocible del genotipo. Por ejemplo, el color de los ojos (fenotipo) es la manifestación visible de los genes (genotipo) que determina esa característica<sup>(7)</sup>.

### **1.6 LOS CROMOSOMAS.**

Todas las células que forman un ser humano proceden de una sola célula, el cigoto, la cual se origina al unirse las células sexuales, el óvulo y el espermatozoide. Ambas células sexuales o gametos, se caracterizan por tener dentro del núcleo solo 23 cromosomas (22 autosomas y un cromosoma sexual), o sea la mitad del número de cromosomas propio de la especie (número haploide). Los cromosomas son los portadores de los genes, constituyéndose en estructuras celulares de gran importancia en

la transmisión del material genético durante la reproducción. Los cromosomas están formados por *cromatina*, la cual está compuesta por una parte de ADN macromolecular y dos partes de proteínas. (Figura 4.) Estas son pequeñas histonas básicas y proteínas no histónicas; existen además pequeñas cantidades de ARN, lípidos, polisacáridos e iones metálicos, cuya función es poco conocida

La unidad estructural de la cromatina es el *nucleosoma*. Esta formado por un núcleo de 8 histonas sobre el que se deposita el ADN. La *cromatina* se presenta en dos estructuras de distinta condensación que se tiñen de manera diferente. La *eucromatina* lo hace débilmente en las primeras etapas de la *mitosis* y de la *meiosis*. Las regiones eucromáticas del cromosoma constituyen la parte genéticamente activa del núcleo en interfase y se caracterizan por una síntesis de ARN muy intensa<sup>(5,7)</sup>.

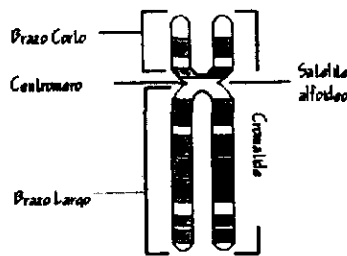


Figura. 1  
Esquema que muestra de manera general la estructura de un cromosoma

En el aspecto funcional hay que distinguir entre *heterocromatina constitutiva* y *facultativa*. La primera se encuentra siempre en los mismos lugares que los cromosomas homólogos y constituye, por consiguiente, un carácter estructural y constante del cromosoma en cuestión. No codifica para la síntesis de ARN y desde el punto de vista estructural, se caracteriza por la presencia de ADN repetitivo, es decir, una serie larga de determinadas secuencias de nucleótidos del ADN que se repiten. Se encuentran a menudo en la región del centrómero. La heterocromatina facultativa, por el contrario, no representa un carácter estructural constante sino que se trata de secciones

eucromáticas condensadas, genéticamente inactivas pero a las que se puede activar de nuevo<sup>(7)</sup>.

## 1.7 LA INDIVIDUALIZACIÓN GENÉTICA DEL SER HUMANO

Cabe ahora preguntarse ¿por qué cada uno de nosotros es diferente a otro? ¿De donde proviene y como se constituye esta individualidad?. Esta individualidad o unicidad comienza desde el momento de la concepción. Las propiedades del patrimonio genético dependen en efecto de como se engendra toda la diversidad genética de la especie.

Varios millares de estas bases están presentes en el cigoto humano; el número de sus combinaciones, de sus posibles modos de ordenarse es tan elevado, que es prácticamente imposible que el azar de las combinaciones genéticas llegue a formar dos cigotos de idéntica estructura molecular, salvo en los gemelos monocigóticos. Por tanto, se puede afirmar en general que en cada huevo humano, la dote genética -el patrimonio hereditario- es rigurosamente exclusivo de este huevo. Todo individuo, al comienzo de la existencia, es único en su tipo. Incluso, aunque la especie humana permaneciera por trillones de años, no existiría repetición genética, no aparecerían en el planeta dos individuos portadores de la misma herencia. Este es uno de los grandes hechos de la biología que jamás será subrayado con la debida fuerza. Cuando el ser humano se encuentra todavía en estado de célula microscópica e invisible, ya está singularizado, es único, ya se halla firmemente establecidas las bases de su yo.

En la colección de moléculas que ha heredado de sus padres, una gran parte de la persona se halla irrevocablemente inscrita y determinada con anterioridad. Los rasgos del rostro, la coloración y calidad del cabello; la forma, la longitud, el modo de implantación de las pestañas y de las cejas; la coloración de la piel; el dibujo y el color del iris; el volumen, la forma y los pliegues de la lengua; las dimensiones y las líneas del pabellón de la oreja; la forma y distribución de los dientes; la disposición de las líneas de la mano y de las crestas de las papilas táctiles; el grupo sanguíneo; el factor Rh (Rhesus), el haplotipo HLA<sup>(5)</sup>.

La especificidad de acción del gen solo queda garantizada cuando es muy estable, es decir, cuando su estructura se transmite invariable de una generación a otra. Hemos de adjudicar por tanto al gen un grado elevado de estabilidad, de constancia en el sentido

**evolutivo.** Se conocen, no obstante, numerosos casos en los que no se cumple este postulado, en los que la estructura génica se modifica por vía espontánea o experimental. A estos procesos se les denominan **mutaciones génicas**. El gen pasa en el marco de este proceso desde un estadio inicial estable a otro nuevo, también estable. Conduce a la acuñación de un nuevo carácter que se transmite después de una generación a otra en lugar del original. La mutabilidad es una de las características fundamentales de un gen, que demuestran que de un gen son posibles varias estructuras funcionales que surgen a partir de una determinada estructura inicial en el curso del desarrollo evolutivo.

Se considera que las mutaciones son uno de los principales mecanismos que originan la variación, sin embargo, por sí sola, no explica la gran variabilidad genética en todas las poblaciones, puesto que las tasas de mutación son relativamente bajas, comparadas con la cantidad de nuevos organismos que nacen por generación. Por tanto es necesario considerar además de la mutación, a la recombinación genética y a la segregación cromosómica como las responsables más directas de la variabilidad<sub>(1,3,5,6,7)</sub>.

La recombinación genética permite que genes ubicados en un mismo cromosoma sean intercambiados con los genes alelos ubicados en el cromosoma homólogo, de modo que se recombinan o mezclan las unidades de ligamiento existentes en cada cromosoma. De no ocurrir la recombinación, los genes de un cromosoma, ligados físicamente, se heredarían sin variación de padres a hijos.

La meiosis origina en forma directa el número haploide de cromosomas que caracteriza a cada gameto; reducción que se verifica con una segregación independiente de los 23 pares de cromosomas humanos, esto es, el par, 1', segrega en forma independiente del par 2, 2', y así sucesivamente los 23 pares de cromosomas, recordando que un cromosoma de cada par es materno y el otro paterno, de modo que una célula sexual (óvulo y espermatozoide) recibe un surtido independiente de cromosomas maternos o paternos. Si el humano tiene 23 pares, las combinaciones posibles (células sexuales) que pueden formarse, es igual a  $2^{23} = 8.388.608$  a partir de una célula madre, ya sea ovogonia o espermatogonia.

La segregación cromosómica independiente explicaría por sí sola, posibilidad nula de que se presenten dos células sexuales idénticas durante la meiosis, sin embargo, la

*variabilidad es amplificada por el mecanismo de la recombinación genética o entrecruzamiento, que también se verifica durante la meiosis, en donde se intercambia información genética entre el par de cromosomas homólogos*<sub>(3.5.6.7)</sub>.

Ahora bien, si se considera el cálculo de heterocigocidad para el humano en 6.7% de un total de 100,000 genes aproximadamente, entonces el hombre puede ser heterocigoto para 6.700 loci, y producir potencialmente  $2^{6.700}$  ( $10^{2.017}$ ) células sexuales diferentes durante la meiosis. Es evidente que esta cifra tan elevada y diversa de células germinales no será producida nunca por un ser humano. De lo anterior puede deducirse que: a) *Nunca han existido dos seres humanos genéticamente idénticos a excepción de los gemelos monocigóticos, o bien, sujetos producidos por clonación* y b) *La individualidad humana radica en la carga genética que posee*<sub>(3.6.7)</sub>.

## Capítulo 2

### 2.0 MARCADORES GENÉTICOS

Un individuo posee un patrimonio genético único que hereda de sus padres, esta individualidad puede ser definida por la identificación de sus factores hereditarios conocidos como marcadores genéticos. Las características que definen a un marcador genético como tal depende de que el medio no intervenga en su expresión, que se conozca su modo de herencia y que permanezca sin cambio en la vida de los individuos

(4,8,9,10)

La tipificación de un marcador genético tiene aplicaciones bastante concretas: en biología molecular se utiliza para estudios de evolución<sup>(9)</sup>, en genética de poblaciones para la clasificación de distintos grupos humanos, en estudios antropológicos <sup>(9,10)</sup>. En medicina para la detección de enfermedades<sup>(4,8)</sup>, en genética molecular para la formación de mapas cromosómicos y en el área legal y forense con fines de identificación, reconocimiento de grupos sanguíneos y para pruebas de paternidad<sup>(4,8,9,10)</sup>. Los marcadores genéticos pueden ser clasificados en protéicos y de ADN.

### 2.1 MARCADORES PROTEICOS

Como su nombre lo indica, los marcadores protéicos, son aquellos que se involucran la identificación de una proteína, de modo directo, a través de su patrón de migración electroforético o en forma indirecta a través de una reacción inmune. En este grupo están los marcadores de grupo sanguíneo y el sistema HLA<sup>(9)</sup>.

Otras proteínas que se utilizan como marcadores son las enzimas eritrocitarias (estearasas y fosfatasas), proteínas séricas (haptoglobinas y la transferrina), hemoglobina y albúmina entre otras, en cada una de ellas se observan distintas variantes, ya que su síntesis esta controlada directamente por los diferentes alelos de cada gen<sup>(10)</sup>.

### 2.2 MARCADORES DE ADN

La tipificación de estos marcadores involucra directamente el análisis de la estructura del ADN. Se observan dos tipos de polimorfismo que son: los polimorfismos de sitio o



RFLP (por sus siglas en inglés *restriction fragment length polymorphism*) y los polimorfismos de longitud o VNTR. Figura 5.0

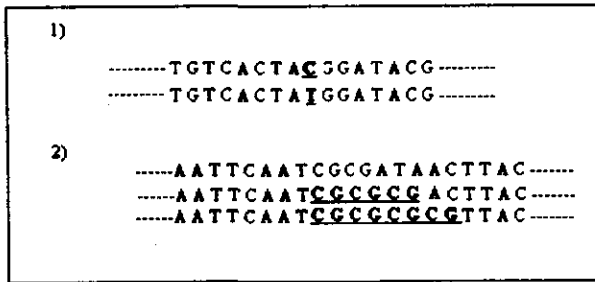


Fig. 5 Tipos de polimorfismos en el genoma. 1) variación en un simple cambio de bases (RFLP) y 2) variación en las repeticiones en tandem de la secuencia base (VNTR).

### 2.3 TIPIFICACIÓN DEL ADN CON PROPOSITOS DE IDENTIFICACIÓN LEGAL Y FORENSE.

Por más de dos décadas las metodologías tradicionales que se utilizaban para establecer la identidad, se fundamentaban en el análisis de las evidencias biológicas, estas involucraban la separación de proteínas y/o la identificación de los grupos sanguíneos. El problema de la tipificación resulta de las condiciones en las que se encuentre la muestra o evidencia, sobre todo cuando se trata de muestras biológicas como manchas de sangre o semen. Estas dificultades se deben a que los indicios recolectados en el lugar de los hechos frecuentemente se ven expuestos a factores ambientales como la temperatura, contaminación, exposición a la luz, humedad, aire, los cuales provocan su degradación y contaminación y con ello que la evidencia recolectada sea escasa y pobre en calidad.

Durante mucho tiempo se estudio al gen de manera indirecta, ahora es posible caracterizar polimorfismos en el ámbito molecular gracias a la aplicación de técnicas como la PCR.

### **2.3.1 APLICACIÓN DE LA PCR EN LA INDIVIDUALIZACIÓN.**

Sin lugar a dudas, el advenimiento de la PCR permitió un gran avance en las pruebas de identificación. La ventaja de esta técnica radica en la capacidad de generar miles de copias de una secuencia específica de ADN (un gen o polimorfismos moleculares) y con ello aportar material suficiente para llevar a cabo una tipificación en el ámbito molecular aún cuando la cantidad de ADN sea muy pequeña. Esto no sucede con la metodología de RFLP pues ésta necesita de por lo menos 50 ng de ADN de alto peso molecular además de que se consume más tiempo en el estudio y requiere el uso de sondas marcadas con radioactividad. (1,2,10,14,15)

### **2.4 MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS EN EL ÁREA FORENSE.**

**Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA región DQ alfa).** La tipificación de la región DQ alfa del complejo principal de histocompatibilidad no sólo es indispensable en el estudio de enfermedades del sistema inmunitario sino que se ha convertido en una herramienta imprescindible en la identificación de individuos por su alta variabilidad alélica. Este fue el primer sistema que se utilizó con fines forenses aplicando la PCR. Se han observado en la región DQ A1 seis alelos (DQ alfa 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 4) cuya combinación definen 21 genotipos (14).

**“Polymarker”.** Este estudio permite la tipificación de cinco loci genéticos que son el receptor de lipoproteínas de baja densidad ( LDLR ), glicoforina A ( GYPA), gammaglobina hemoglobina G ( HBGG ), D7S8 y componente específico de grupo ( GC ). En cada locus sólo se encuentran 2 ó 3 alelos.

**Sistema D1S80.** La tipificación de este sistema consiste en la detección de secuencias repetitivas o VNTR que se localiza en el locus D1S80. Esta secuencia fue identificada por la sonda pMCT118 aplicando la PCR, está formada por 16 pb que se repiten de 14 a 41 veces y el número de veces en que se repite la secuencia define a cada alelo, es decir que el alelo 14 se determina así porque la secuencia base se repite catorce veces y así es

para los demás alelos. Esta región posee una alta variabilidad alélica ya que se han encontrado hasta el momento 29 alelos que definen 435 genotipos. (9)

El sistema D1S80 se hereda de manera codominante. Para observar los alelos se aplica la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), esta técnica permite separar los alelos dependiendo de su tamaño(9).

## Capítulo 3.

### DETERMINANTES DEL SEXO.

#### 3.1.PATRONES

En la determinación del sexo de muchas especies está implicado un par de cromosomas heteromórficos, denominados **cromosomas sexuales**. Sin embargo, ésta no es la única manera posible de determinar el sexo. El sexo también puede ser controlado (1) por la ploidia de un individuo, como en muchos himenópteros (abejas, hormigas, avispas), en los cuales los machos son haploides y las hembras diploides; (2) mediante mecanismos alélicos en los que el sexo está determinado por un único alelo o por alelos múltiples no asociados con cromosomas heteromórficos; o (3) por factores ambientales<sub>(6,7)</sub>.

#### 3.2.CROMOSOMAS SEXUALES

Existen básicamente cuatro tipos de mecanismos cromosómicos de determinación de sexo: XY, ZW, X0, y los mecanismos de cromosomas múltiples. En el caso XY, las hembras poseen un par homomórfico de cromosomas (XX), como en los seres humanos o en la mosca de la fruta, los machos son heteromórficos (XY). En el caso ZW, los machos son homomórficos (ZZ) y las hembras heteromorficas (ZW). En el caso X0, existe *sólo un cromosoma sexual*, como en algunos saltamontes y escarabajos, las hembras son generalmente XX y los machos X0. Es necesario señalar que no son los cromosomas en sí los que están determinando el sexo, si no los genes que contienen. En general el genotipo determina el tipo de gónada, que a su vez controla el fenotipo del organismo mediante la producción de hormonas masculinas o femeninas<sub>(5,6,7)</sub>.

#### 3.3.EL SISTEMA XY

En la especie humana el sexo está determinado por un sistema XY. Las mujeres poseen cuarenta y seis cromosomas ordenados en veintitrés pares de homólogos homomórficos. Los hombres, con el mismo número de cromosomas, tienen veintidós pares homomórficos y un par heteromórfico que se denomina el par XY. Durante la meiosis, las mujeres sólo producen gametos que contienen el cromosoma X mientras que los hombres producen dos tipos de gametos: los que llevan el cromosoma X y los que

llevar el Y. Por esta razón nos referimos a las mujeres como **homogaméticas** y a los hombres como **heterogaméticos**. (6,7)

### 3.4. DETERMINACIÓN DEL SEXO EN EL HUMANO.

Puesto que las personas de genotipo XO son mujeres (que presentan el síndrome de Turner), parece razonable concluir que en la especie humana el cromosoma Y es el **determinante masculino**. Esto viene ratificado por el hecho de que los individuos con síndrome de Klinefelter (XXY, XXXY, XXXXY) son todos varones, y que los individuos con cariotipos XXX, XXXX y otros con múltiples X son todas mujeres. Durante mucho tiempo se ha buscado un único gen, un **factor determinante de los testículos (TDF, testis-determining factor)** que actúe como un interruptor sexual en los cromosomas Y e inicie la masculinidad. Los embriólogos habían descubierto que durante el primer mes del desarrollo embrionario en los seres humanos, las gónadas que se forman no son testículos ni ovarios, sino de sexo indeterminado. Aproximadamente hacia las seis o siete semanas de desarrollo, las gónadas indeterminadas se convierten en ovarios o bien en testículos. En los años 50 Ernst Eichwald encontró que los machos tenían una proteína sobre la superficie de sus células que no se hallaban en las hembras: descubrió que los ratones hembra rechazaban injertos de piel de hermanos genéticamente idénticos, mientras que los injertos de las hermanas eran aceptados por sus hermanos. Esto implica la existencia de un antígeno en la superficie de las células masculinas que no está presente en las femeninas. Esta proteína se denominó *antígeno de histocompatibilidad del Y (antígeno H-Y)*. Se encontró que el gen que codificaba esta proteína estaba localizado en el cromosoma Y cerca del centrómero, probablemente en el brazo largo del cromosoma. Primero se pensó que era el interruptor de la cascada *determinan del sexo*. Si el gen estaba presente, las gónadas empezarían a desarrollarse como testículos. El más avanzado de la masculinidad, que incluye las características sexuales secundarias masculinas, es consecuencia de la acción de la testosterona que producen los testículos funcionales. Si el gen está ausente, el desarrollo de las gónadas proseguiría para formar ovarios. Recientemente, sin embargo, y a partir del estudio de individuos con "sexo invertido", se ha demostrado que esa teoría era equivocada.

Los individuos con sexo invertido son hombres XX o mujeres XY. David Page, en el Instituto Whitehead de investigación Biomédica, encontró veinte hombres XX que tenían un pequeño trozo del brazo corto del cromosoma Y unido a uno de sus cromosomas X. También encontró seis mujeres XY en las que el cromosoma Y carecía del mismo pequeño trozo al final de su brazo corto. Hoy en día se sabe que esta región lleva el factor determinante de los testículos. El primer gen candidato que se creyó que codificaba el factor determinante de los testículos se denominó **gen ZFY**, (por *zinc finger on Y* o dedo de zinc en el cromosoma Y). Los dedos de Zinc son configuraciones proteicas que interactúan con el ADN. Sin embargo, se han encontrado hombres que carecen del gen ZFY. A partir de estudio con ratones se ha determinado que el gen ZFY controla el inicio del desarrollo de los espermatozoides, pero no la masculinidad<sup>(6,7,19,31)</sup>. En 1991, Robin Lovell-Badge y Peter Goodfellow y sus colaboradores en Inglaterra aislaron un gen denominado **SRY (Sex-determining region Y o región del cromosoma Y determinante del sexo)** adyacente al gen ZFY. Un gen homólogo, *Sry*, se ha aislado en los ratones. El gen *Sry* se ha identificado con seguridad como el factor determinante de los testículos porque cuando se inyecta en ratones hembra normales (XX) hace que se desarrollen como machos. Aunque estos machos XX son estériles, parecen machos normales en cualquier otro aspecto. Obsérvese también que los sistemas del ratón y del hombre son muy semejantes genéticamente y que en ambos se han aislado genes homólogos. Sin embargo, hasta el momento, el gen humano SRY no ha convertido hembras de ratón XX en machos. <sup>(19-31)</sup>

### **3.4.1 CENTRÓMERO Y REGIONES REPETIDAS ESPECIFICAS DEL CROMOSOMA Y**

De un estudio realizado recientemente en el cual se mapeo físicamente el cromosoma Y, se termino la composición de la región eucromatica de este cromosoma sexual, para este estudio se empleo un ensamble de 198 clones de ADN recombinante, cada uno de los cuales contenía una porción del cromosoma Y, para luego correlacionarla con una biblioteca de cromosomas artificiales de levadura (YAC por sus siglas en ingles de *yeast artificial chromosome*). De esta manera se logro mapear físicamente al cromosoma e identificar los componentes de la región eucromatica.

En el análisis de la región centromérica se revela que contiene un bloque de repeticiones alfoideas flanqueada por diversos arreglos repetitivos, los cuales están presentes en mucha mayor cantidad que en otros cromosomas humanos. Las repeticiones alfoideas Y (DYZ3) son lo suficientemente diferentes de las presentes en los otros cromosomas, por lo que es posible identificar las regiones específicas alfoideas del cromosoma Y.

## Capítulo 4.

### PRINCIPIOS DE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN USANDO PCR

La amplificación por PCR es una reacción enzimática que utiliza ADN polimerasa. Las propiedades catalíticas de la ADN polimerasa, incluyen los requerimientos del sustrato (Cebadores y ADN patrón),  $V_{max}$ . ( nucleótidos incorporados por segundo por molécula de enzima), desarrollo (bases agregadas por extensión). Todas las ADN polimerasa catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo terminal 3'-OH de la cadena creciente y el grupo 5'-PO<sub>4</sub> del deoxinucleótido trifosfato (dNTP). Cada dNTP entrante es determinado por la secuencia molde. (1,2,6,10,12)

La amplificación del ADN se efectúa por una serie de ciclos repetidos de la reacción en cadena de la polimerasa, cada uno de los cuales tiene tres diferentes temperaturas Ver Fig. 6.0

- I. - Desnaturalización del ADN patrón o molde a 94° a 96° C.
- II. - Alineación de los Cebadores al ADN molde 42° a 60° C
- III. - Extensión de los cebadores por la ADN polimerasa de 60° a 72° C.

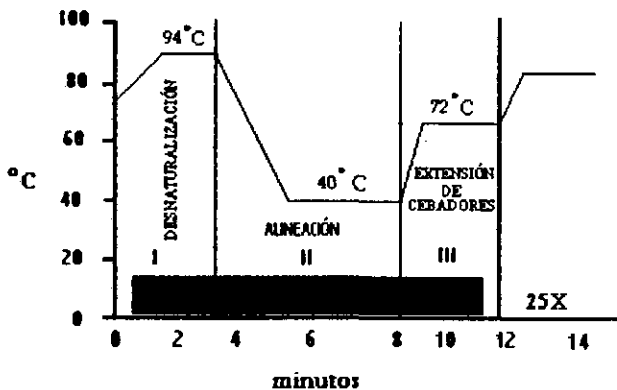


Figura 6. Pasos en los ciclos de PCR



La reacción de amplificación contiene un par de cebadores o nucleótidos arreglados de tal manera que cada uno se hibrida a la hebra opuesta de la cadena patrón previamente desnaturalizada y la extensión es orientada hacia el extremo 3'-OH. Con cada extensión del producto se obtiene la secuencia complementaria del otro cebador, y el producto de cada extensión sirve como un patrón en el próximo ciclo de PCR.

En el primer paso del ciclo de PCR, el ADN que sirve como molde es mezclado con un gran exceso de los dos cebadores de amplificación. La mezcla se desnaturaliza de 94 a 96°C. En el segundo paso del ciclo, la reacción es llevada a la temperatura óptima en que se alinean los cebadores con la secuencia específica. En el tercer paso, la temperatura es de 72°C, la cual se encuentra por abajo de la óptima para la Taq ADN pol I, pero no encima de la temperatura en que se alinean los cebadores con la región específica de ADN. Los cebadores se extienden para dar una nueva hebra de ADN de cada patrón formado, cada uno con un extremo 5' terminal (determinado por la secuencia de los cebadores) y un indefinido 3' terminal. (1.2.7.10,12)

#### **4.1. LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.**

##### **4.1.1 El proceso de la PCR.**

El proceso de la PCR se ilustra en la figura 7. En sus elementos básicos, este proceso es análogo al mecanismo celular para la replicación del ADN. Este proceso involucra tres pasos.

1. La doble cadena de ADN es disociada en dos cadenas simples por incubación a alta temperatura, típicamente a 94°C. Las dos cadenas sirven como patrones para la replicación de sus secuencias complementarias.
2. Se disminuye la temperatura para permitir que los cebadores o iniciadores se enlacen a su secuencia complementaria en la cadena patrón de ADN. Los iniciadores se diseñan para que se hibriden a la cadena opuesta de la región específica o blanco del ADN.
3. Los iniciadores se extienden por la adición complementaria de nucleótidos desde el extremo terminal 3' de la cadena del iniciador empleando la secuencia blanco como patrón; este proceso es mediado por una ADN polimerasa.

De esta manera al final de estos pasos, se han hecho nuevas moléculas de ADN de doble cadena, las cuales servirán subsecuentemente como patrón en los posteriores ciclos de replicación. Con cada ciclo adicional, la secuencia blanco es doblada en número de copias; la secuencia blanco es así misma amplificada de manera exponencial. (1,3,5,11)

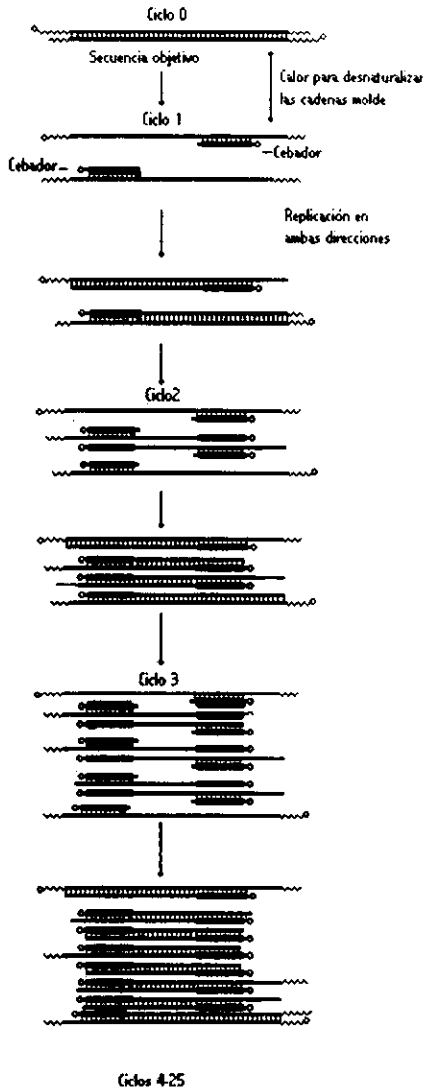
#### 4.2. PROPIEDADES DE LA ADN POLIMERASA

- Cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-OH y el grupo 5'-PO<sub>4</sub> del deoxirribonucleótido (dNTP's) entrante.
- Primero se obtuvo de la bacteria termofílica Gram negativa *Thermus aquaticus*
- Altamente purificada tiene una temperatura óptima (T<sub>op</sub>) de 75 a 80° C, con una velocidad máxima de incorporación de dNTP's (V<sub>max</sub>) de aproximadamente 150 nucleótidos/segundo/molécula de enzima<sub>(11)</sub>

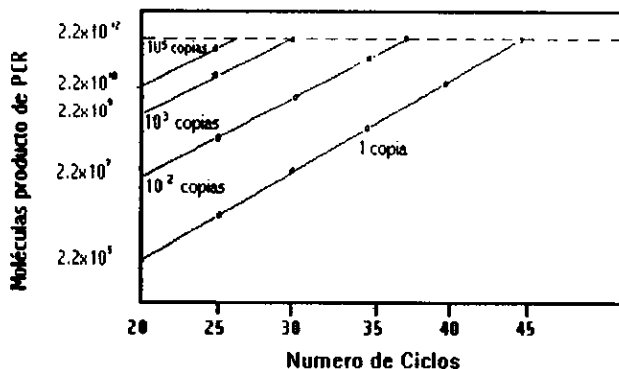
#### 4.3 VARIABLES QUE AFECTAN LA AMPLIFICACIÓN.

Tabla 4

| VARIABLE                         | EFEECTO  | COMENTARIO  |
|----------------------------------|--|---|
| Primera extensión de cebadores.  |  | Los primeros ciclos de amplificación  |
| Primeros ciclos de amplificación | Determinan el producto final de amplificación.   | constituyen una fase de reconocimiento en la que se seleccionan los segmentos específicos para la amplificación. Durante estos ciclos cada cebador actúa como una sonda que reconocen todas las secuencias específicas. |
| Número de ciclos en la reacción  | Efecto meseta ( <i>Plateau</i> )<br>Después de 20 a 40 ciclos, la reacción entra a una fase lineal donde la acumulación exponencial de los productos se ve disminuida. (Ver figura 8)                                    | La disminución de la amplificación exponencial, ocurre cuando los productos alcanzan aproximadamente 10 <sup>8</sup> (aproximadamente 10 <sup>12</sup> moléculas en 100µM de reacción) (1,3,5,11)                       |
| Cantidad de Taq ADN polimerasa   | Cuando el número de moléculas de ADN excede el número de moléculas de enzima, la reacción se vuelve lineal ya que la cantidad de productos en cada uno de los ciclos está determinado por la cantidad de enzima (1,3,11) | En una reacción típica 2.5 U de Taq pol es aproximadamente 10 <sup>9</sup> , lo que es inicialmente un exceso de unas 200,000 veces de moléculas de enzima sobre el patrón de ADN.                                      |



**Figura 7. Mecanismo de la reacción en cadena de la polimerasa.** Como ya se describió en el texto, cada ciclo consta de tres pasos: Separación de la hebra molde, hibridación y extensión de los cebadores. (Figura tomada de Science 240:1409(1989)).



**Figura 8**

La calidad y especificidad de la amplificación por PCR son dependientes de la secuencia que se amplifica y de las condiciones usadas (La secuencia de los iniciadores, el programa del termociclador tiempos y temperatura de los ciclos), la composición de la mezcla de reacción, la cantidad y naturaleza de la región blanco de ADN en la muestra, y el número de ciclos empleados). Las variables para un sistema en particular difieren uno de otro, por lo que, no es posible aun predecir las condiciones óptimas de amplificación.

La especificidad en la hibridación depende de la longitud y secuencia de los iniciadores empleados y de la temperatura de alineación. En general, los iniciadores de 20 a 25 pb de longitud empleados para amplificar ADN de secuencias únicas, suelen tener especificidad si se emplean temperaturas de alineación de 60 a 65°C<sup>(1,3,5,11,15)</sup>.

**Reactivos.**

Para una amplificación eficiente es necesario una gran calidad en los reactivos

#### **4.4. Diseño y preparación de los Cebadores de Amplificación de PCR.**

La calidad de los cebadores o iniciadores de PCR es el factor principal en el éxito de cualquier aplicación basada en PCR. El diseño de los cebadores es fundamental en los resultados que se deseen al amplificar una secuencia específica. Es por eso que la mejor opción al seleccionar un par de cebadores es hacer uso de uno de los muchos programas computarizados que se encuentran disponibles para tal propósito. Los programas se pueden adquirir directamente a una casa comercial de biología molecular o bien, por medio, de Internet.

En general, estos programas identifican características críticas y permite la búsqueda de un par de cebadores con propiedades conocidas y propiedades de amplificación predecibles, incluyendo el tamaño del producto amplificado, la temperatura óptima de alineación y su peso molecular, localización, y secuencia de ADN de cada uno de los Cebadores<sub>(11)</sub>.

##### **4.4.1. Calidad de los cebadores sintetizados**

Cuando se utilizan secuencias ya determinadas o publicadas para la síntesis de los cebadores, se elige la mejor región la cual deberá cumplir con ciertos requerimientos básicos para asegurar el éxito en la obtención de productos de amplificación; estos requerimientos de detallan en este capítulo.

El factor, más importante en la elección de la región iniciadora es su precisión y el costo que implique la síntesis.

#### **4.5. MANEJO Y ALMACENAJE DE LOS CEBADORES.**

Los Oligos (cebadores) de amplificación de PCR, deberán ser almacenados en una solución amortiguadora cuya concentración sea 10mM de Tris-HCl (pH= 8.3), 0.1mM EDTA y a -20° C, estas soluciones amortiguadoras a esta concentración y con algunos otros aditivos de amplificación se encuentran disponibles de manera comercial.

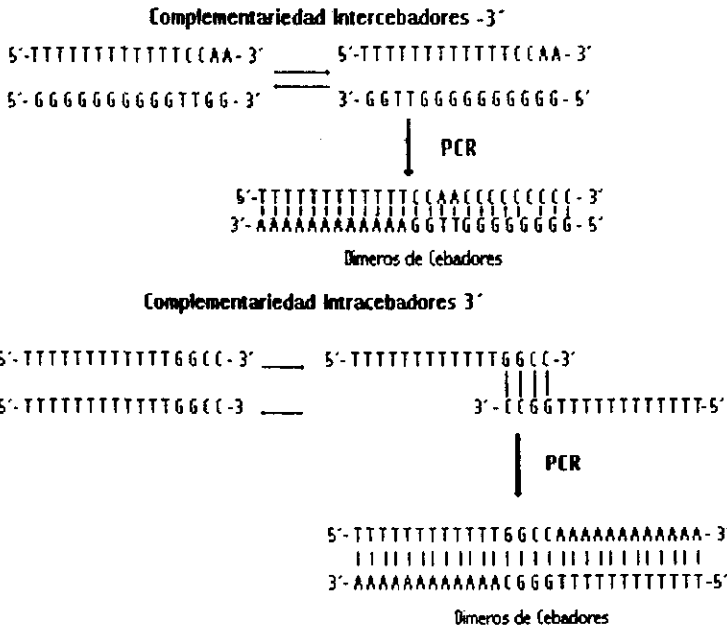
El ADN en solución es un ácido débil, por lo que los enlaces fosfodiéster pueden romperse en soluciones amortiguadoras no adecuadas. En cuanto se tengan los cebadores éstos deberán congelarse en alícuotas calculadas con anterioridad, para que solo se descongelen de una en una y manteniéndolas en baño de hielo o mínimo a 4°C

cuando se estén usando. Los cebadores deberán guardarse en un congelador separado de otros reactivos de PCR para evitar en lo mínimo la posibilidad de contaminación.

#### **4.5.1. Elección de los iniciadores y secuencia blanco de ADN**

Los oligonucleótidos iniciadores tienen las siguientes características:

- Longitud: de 18-30 pb. Mas cortos o más largos también dan buenos resultados. Los iniciadores pueden ser similares en longitud y composición, en tanto que difieren en su temperatura de disociación (*melting*) ( $T_m$ , la temperatura a la cual el 50% de las cadenas están separadas).
- El contenido de GC puede ser similar al contenido de GC presente en la hebra molde y del otro iniciador, idealmente de 50-60 % GC.
- No debe tener auto complementariedad (para evitar estructuras secundarias) o complementariedad con el otro iniciador (Cuando existe la hibridación Inter o Intra molecular del par de cebadores). Esta situación provoca la formación de productos inespecíficos o bandas inespecíficas cuando se observan teñidas en geles Fig. 9.0. En la tinción aparecen o se identifican como una porción brillante que presenta un bajo peso molecular y movilidad ligeramente menor a la de los cebadores solos teñidos en el gel (los dímeros como se le llaman comúnmente a estos productos se pueden identificar de manera positiva en el control negativo) Existen programas de computadora que resuelven este problema<sub>(11,15)</sub>.
- Evitar que amplifique para regiones inespecíficas.
- Temperatura de alineación ( $T_m$ ). Un factor determinante de la especificidad y eficiencia de la PCR es la temperatura de alineación empleada en el segundo paso de los ciclos de PCR. Si esta temperatura es muy baja, la especificidad de la reacción se verá disminuida por la posibilidad de amplificarse regiones inespecíficas; y si esta temperatura es muy alta, la eficiencia se reduce también como resultado de una pobre alineación



**FIGURA. 9.** La complementariedad Inter e Intra Cebadores dirigen la formación de los dímeros de cebadores. Nótese que la complementariedad del extremo terminal -3' es importante en la generación de estos artefactos.

**4.5.2. La secuencia molde o blanco a amplificarse tiene las siguientes indicaciones.**

- Longitud: 150-500 pb. Aunque también amplifican eficientemente longitudes entre 100-2000 pb.
- Secuencia única, para evitar competición con secuencias no deseadas.
- De gran número de copias, ya que se minimiza el número de ciclos en la amplificación deseada. Por supuesto que la PCR es, altamente eficiente en detectar especies de ADN extraño, pero el riesgo de confusión por productos inespecíficos se incrementa si el número de copias de la secuencia molde o blanco es baja.
- Un diagnóstico por enzimas de restricción de sitio, para complementar la verificación correcta de los productos de amplificación.
- Una secuencia intrónica, para distinguir productos de amplificación genómica de otros productos de amplificación contaminante.

- Una secuencia que pueda ser detectada específicamente con una sonda preparada en el laboratorio.

#### **4.6. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN EN PCR**

Si no se observan productos de amplificación bajo las condiciones “estándares”, descritas en los protocolos de biología molecular y técnicas de PCR, posiblemente se trate de un error en el diseño experimental, por lo que se debe revisar para identificar el posible error. Particularmente de debe hacer énfasis en lo que respecta al diseño de los iniciadores (cebadores), cálculo de la temperatura de alineación ( $T_m$ ) (debe tomarse en cuenta si el cálculo se hizo a una concentración de 50 mM de sal), se debe realizar también el diseño de los Oligos (particularmente con respecto a la orientación del grupo 3'-OH) y ver que no existan errores al copiar la secuencia. La más común de las causas de una pobre amplificación se presenta cuando se emplean condiciones inadecuadas al programar el termociclador (Condiciones del termociclador), y es también, la más fácil de corregir. Por principio de cuenta se debe evitar el programa tipo turbo que tienen programado los termocicladores, el cual incluye un paso de 15 segundos de desnaturalización o alineación, generalmente son adecuados ciclos de cinco minutos de desnaturalización. Los termocicladores varían mucho, con respecto a la temperatura que muestran en la pantalla y la que realmente alcanza el tubo de reacción. Esta información respecto a la temperatura mostrada contra la temperatura del tubo de reacción, la proporciona el fabricante del equipo.

Aunque la PCR es una reacción compleja (13 componentes por lo menos), los parámetros que afectan o influyen el rendimiento y eficiencia de la reacción pueden ser ajustados sistemáticamente



**Tabla 5**

**Composición de una reacción típica de PCR**

| <b>Componente</b>         | <b>Solución Stock</b>   | <b>Volumen<br/>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>Concentración<br/>Final</b> |
|---------------------------|-------------------------|--|--------------------------------|
| Amortiguador<br>reacción* | de 10x                  | 5                                      | 1x                             |
| MgCl <sub>2</sub>         | 25 mM                   | 3                                      | 1.5 mM                         |
| DGTP                      | 10 mM                   |  | 200 $\mu$ M                    |
| DATP                      | 10 mM                   |  | 200 $\mu$ M                    |
| DTTP                      | 10 mM                   |  | 200 $\mu$ M                    |
| DCTP                      | 10 mM                   |  | 200 $\mu$ M                    |
| Cebador 1                 | 50 pmol/ $\mu$ l        |  | 1.0 pmol/ $\mu$ l              |
| Cebador 2                 | 50 pmol/ $\mu$ l        |  | 1.0 pmol/ $\mu$ l              |
| ADN Patrón                | 0.01-1 $\mu$ g/ $\mu$ l |  |                                |
| Taq ADN pol I             | 5 U/ $\mu$ l            |  | 2.5 U Total                    |

\*El amortiguador de reacción 10x contiene 100 mM de Tris-HCl, pH 8.3, y 500 mM KCl

El principal control de las variables incluye:

1. La concentración de los Oligos y el patrón de ADN.
2. La concentración del ión Mg<sup>2+</sup>,
3. La concentración de dNTP's,
4. La temperatura de Alineación y las condiciones del termociclador.

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado estuches para optimizar reacciones de PCR. las cuales contienen un lote de 60 soluciones amortiguadoras 10x, premezcladas que varían en concentración de MgCl<sub>2</sub> y dNTP's simultáneamente.

Sin embargo, es posible optimizar la reacción de PCR como se describe a continuación.

#### 4.7. PASOS EN LA OPTIMIZACIÓN DE UNA REACCIÓN DE PCR.

##### 4.7.1. Optimización de la concentración del Ión Magnesio.

El nivel del ión divalente es crítico en la actividad de la enzima polimerizadora Taq pol I. Debido a que la concentración óptima de  $Mg^{2+}$  es muy baja (1.5mM), concentraciones elevadas de agentes quelantes tales como el EDTA y grupos iónicos cargados negativamente, pueden reducir significativamente la ejecución de la reacción<sup>(32,33,43,51)</sup>. Si no existen problemas en el diseño de los Oligos y en el ciclaje, la concentración de  $Mg^{2+}$  puede ser optimizada empleando el protocolo que se muestra en la tabla siguiente:

**Tabla 6**

**Titulación de la concentración de  $Mg^{++}$**

| Tubo # | ADN               | H <sub>2</sub> O<br>ml | Mezcla de<br>Reacción (ml) | MgCl <sub>2</sub><br>(mM) |
|--------|-------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1      | Control 2 $\mu$ l | 12                     | 36                         | 0.0                       |
| 2      | Control 2 $\mu$ l | 11                     | 36                         | 0.5                       |
| 3      | Control 2 $\mu$ l | 10                     |                            | 1.0                       |
| 4      | Control 2 $\mu$ l | 9                      |                            | 1.5                       |
| 5      | Control 2 $\mu$ l | 8                      |                            | 2.0                       |
| 6      | Control 2 $\mu$ l | 7                      |                            | 2.5                       |
| 7      | Control 2 $\mu$ l | 6                      |                            | 3.0                       |
| 8      | Control 2 $\mu$ l | 4                      |                            | 4.0                       |
| 9      | Control 2 $\mu$ l | 2                      |                            | 5.0                       |
| 10     | Control 2 $\mu$ l |                        | 36                         | 6.0                       |
| 11     | Blanco            | 4                      | 36                         | 1.5                       |

Protocolo simple para optimizar una reacción de PCR

##### 4.7.2. Diseño de la Mezcla de Reacción.

Para muchos propósitos, la mezcla de reacción estándar, suele dar resultados eficientes y amplificaciones específicas. Sin embargo, estas son las variables que menos críticamente afectan a la eficiencia y especificidad en la reacción de PCR; las más importantes de estas

variables y que afecta de manera crítica, son la concentración de ión magnesio y la concentración de los oligonucleótidos o iniciadores<sup>(43,51)</sup>.

El número óptimo de moléculas de ADN como patrón es de entre  $10^5$  y  $10^6$  <sup>(3)</sup>. Para genes de copia única esto corresponde a aproximadamente 1µg de ADN genómico humano y 1pg de plásmido de unos 6-Kpb<sup>(43)</sup>.

La optimización de la mezcla de reacción para un par particular de oligonucleótidos iniciadores frecuentemente involucra los dos pasos siguientes:

1. **Optimización de la concentración de  $Mg^{2+}$ .** Amplificar el patrón de ADN con las siguientes concentraciones de  $Mg^{2+}$ : 1.5; 3.0; 4,5; 6.0; y 7.5 mM.
2. **Optimización de la concentración de cebadores.** Amplificar el patrón de ADN con la mejor concentración de  $Mg^{2+}$  (determinada anteriormente), con las siguientes concentraciones de cada iniciador: 0.05; 0.1; 0.25; 0.5; y 1.0 µM

#### **4.8. ELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN.**

Una vez que se ha diseñado la mezcla de reacción, las siguientes indicaciones son útiles en muchos de los casos para obtener resultados de amplificación eficientes y específicos. Sin embargo existen ocasiones en que se torna necesario el cambio de las condiciones de reacción para el par de cebadores en particular. La variable más importante que se debe optimizar para cualquier par de cebadores es la correspondiente a la temperatura de alineación. Este ajuste es un procedimiento altamente empírico; por ejemplo puede ser necesario que se ajuste la temperatura de alineación por abajo o por arriba de la  $T_m$  esperada para el cebador (nótese que la fórmula que se da abajo para estimar la  $T_m$  no toma en cuenta la concentración del ión magnesio<sup>(10,32,33,42,51)</sup>)

##### **4.8.1 Desnaturalización (94 °C)**

La desnaturalización incompleta es una causa muy frecuente de las fallas en PCR. En el paso inicial de la desnaturalización, para moldes de ADN genómico suelen emplearse 5 min. Y dos minutos para moldes de plásmidos. En los ciclos posteriores, tiempos de 20-30 s a 94°son suficientes. Si se requiere de tiempos largos para una amplificación

exitosa, la temperatura de la mezcla de reacción se puede verificar con termocoples y determinar si realmente se alcanzan las temperaturas deseadas para la desnaturalización.

#### **4.8.2. Alineación (30-60 s)**

El cálculo inicial para determinar la  $T_m$  de los cebadores emplea una fórmula sencilla (43), que es:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Cuyo resultado se expresa en grados centígrados ( $^{\circ}\text{C}$ )

Después de realizado este cálculo, se puede modificar la temperatura de alineación hasta en  $5^{\circ}\text{C}$  abajo de la menor temperatura determinada para cada uno del par de cebadores.

Si se presenta el problema de amplificación de productos inespecíficos, la alineación y extensión puede realizarse en un paso único de entre 60 a  $72^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.8.3. Extensión ( $72^{\circ}\text{C}$ )**

Rinde 1 min / 1 Kb de producto deseado de amplificación. Si el producto requerido es corto ( $< 200$  pb), se puede omitir el paso de la extensión, esto porque la *Taq* Polimerasa es lo suficientemente activa a bajas temperaturas para completar la reacción durante la transición entre la temperatura de alineación y la de desnaturalización(43,45).

### **4.9. PROBLEMAS EN PCR**

Es ampliamente reconocida la gran sensibilidad de la PCR y es esta también su principal limitante, debido a que una sola molécula contaminante de ADN puede ser amplificada, conduciendo a una potencial y grave mal interpretación de los resultados (33,43,51). Se deben seguir condiciones estrictas en el desarrollo de los procesos de PCR, todo esto por obvias razones.

Las principales precauciones que deben de tomarse en cuenta para evitar falsos positivos en los resultados y en su interpretación están listados en la Tabla 7, en un orden aproximado de importancia. Es esencial que se incluya en cada experimento un tubo que contenga todos los componentes excepto al ADN molde (Blanco), y que se

corra junto con las muestras que si contienen ADN para identificar alguna posible contaminación de alguno de los componentes de la mezcla de reacción.

**Tabla 7**

**Precauciones para evitar Contaminación por ADN en Reacciones de PCR**

---

- La preparación de los reactivos de la mezcla de reacción se debe realizar en un área estéril especial, lejos de productos de amplificación o plásmidos. preferentemente en campanas de flujo laminar.
  - Utilice guantes siempre que prepare soluciones; evite tocar la boca del tubo. Para la preparación de mezclas de reacción, emplee pipetas automáticas de dispensación completa estériles y que no se usen para plásmidos o productos de amplificación, se recomienda el uso de puntas con filtro para evitar la formación de aerosoles y para evitar también que la punta de la pipeta entre en contacto con el liquido del tubo. Para volúmenes pequeños se recomienda utilizar micropipetas.
  - Prepare alicuotas de los reactivos y amortiguadores de reacción, y utilice cada alicuota una sola vez.
  - Irradie los reactivos de PCR con luz U.V. Esto permitirá eliminar posibles fuentes contaminantes por plásmidos. (10 minutos a 350 nm en un Transiluminador de U.V.).
  - Algunos científicos han encontrado que se elimina las fuentes de contaminación con el empleo de guantes de látex cubre boca y cofia para el cabello.
- 

Otros problemas comunes en PCR son los relativos a la especificidad y eficiencia en la amplificación de un producto en particular algunos de estos problemas pueden solucionarse con lo expuesto anteriormente en este trabajo; a continuación en la Tabla 6 se da un resumen de las causas mas frecuentes y sus soluciones.

**Tabla 8**

**CONTRATIEMPOS EN PCR**

| <b>PROBLEMA</b>   | <b>CAUSA</b>   | <b>REMEDIO</b>   |
|---|--|--|
| No se detectan productos de amplificación después de varios intentos.               | Temperaturas de alineación inadecuada para el ADN molde.             | Incrementar el tiempo en el paso de la desnaturalización.  |
|   | Secuencia blanco demasiado rara.                                     | Incrementar el número de ciclos (arriba de 60).  |
|   | Temperatura de alineación demasiado alta.                            | Bajar la temperatura hasta en 5°C  |
|   | Alto contenido de GC's de la secuencia blanco.                       | Intentar la reacción con 10% de DMSO   |
|   | Afinidad entre los cebadores.<br>"Sobreamplificación".               | (ver nota a)<br><br>Reducir el numero de ciclos;<br>Reducir el tiempo de extensión.<br>(Nota a). |
| Visualización de bandas múltiples en geles agarosa para productos de amplificación. | Cebadores demasiado cortos o degradados.                             | Reducir el tiempo de extensión.<br>(Nota a).   |
|   | Concentraciones elevadas de dNTP's o enzima.                         | Reducir cualquiera de los dos reactivos.   |
|   | Temperatura de alineación muy baja para cebadores que tienen GC's    | Aumente la temperatura hasta en 5°C.   |
| Visualización de "manchas" continuas de productos amplificados en geles de agarosa. | "Sobreamplificación" <sup>b</sup>                                    | Reducir el numero de ciclos  |
| Predomina la presencia de productos amplificados de alto peso molecular.            | Reamplificación de productos primarios de amplificación.             | Recuperar del gel los productos primarios de la amplificación antes de la reamplificación        |
| Visualización de "Dímeros entre los cebadores".                                     | Complementariedad entre los extremos terminales 3' de los cebadores. | Ver nota a   |

<sup>a</sup> En cada caso el remedio está en incrementar la especificidad de la reacción ya sea incrementando la temperatura de alineación o reduciendo la concentración de los cebadores o ambas cosas.

<sup>b</sup> "Sobreamplificación". denota el uso excesivo de ciclos de PCR, lo cual favorece la amplificación de errores o productos inespecíficos de ADN. Para la amplificación de genes de copia única de ADN genómico, 35 ciclos suelen bastar, aunque para especies raras puedan necesitarse mas, como en el caso de agentes infecciosos de pocas copias.

Los "dímeros entre cebadores" resultan de la alineación y polimerización del extremo 5' del cebador con el extremo 3' del otro cebador, y aparecen como bandas difusas de bajo peso molecular en los geles de agarosa teñidos con Bromuro de etidio.

Si el problema es persistente y único y no se observa ninguna banda de amplificación, tendrá que elegirse una secuencia diferente para uno de los cebadores o los dos: Algunas secuencias son totalmente ineficientes, por razones desconocidas, para emplearse como cebadores de PCR. Si se sospecha esto en un caso en particular, los cebadores deberán probarse cada uno por separado en una reacción de PCR con otros cebadores de eficiencia demostrada, para la misma secuencia molde (si está disponible). De esta manera es posible demostrar en la mayoría de los casos cual de los dos cebadores es el que está fallando.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La PCR ha permitido un gran avance en las pruebas de identificación. La ventaja de esta técnica radica en su capacidad para generar miles de copias de una secuencia específica del ADN y con ello aportar material suficiente para realizar una diferenciación en el ámbito molecular. Como consecuencia se han desarrollado sistemas de identificación por medio de marcadores genéticos en donde el poder de discriminación es más confiable al compararlo con los marcadores tradicionales. (Grupo sanguíneo ABO, Rh, Fosfolucomutasa *PGM*).

Los marcadores genéticos adoptados en el área forense, tienen la característica de ser polimórficos. es decir, que se encuentren más de dos alelos de un gen en particular dentro de una población determinada. Se dice que un locus es polimórfico si las frecuencias de los alelos más comunes son menores de 0.95. (9,10)

En el laboratorio de genética forense se emplean estuches de amplificación comerciales que utilizan la PCR para amplificar secuencias específicas de un marcador genético. Estos sistemas son el HLA DQ $\alpha$ 1, POLYMARKER y DIS80. los cuales son ampliamente usados debido a que los genes involucrados en el estudio presentan una elevada variación alélica dentro de la población. (9)

Todos estos sistemas se encuentran ya bien caracterizados y estandarizados para el uso en el laboratorio de genética forense de la Dirección General de servicios Periciales de la P. G. J. D. F. Sin embargo, y aun cuando el uso de estos marcadores con fines de identificación se ha extendido en el área legal y forense los costos son aun muy elevados para la aplicación de estos marcadores a todas las solicitudes de estudios que se presentan en el laboratorio. La metodología aplicada al estudio de la evidencia sigue un orden lógico de análisis, en el que intervienen inicialmente otras áreas cuyos estudios son menos costosos, y complejos, entre las que podemos mencionar a: hematología, patología, antropología, odontología, explanometría facial, etc., sin embargo, cuando las muestras son muy pobres en cantidad y calidad, los expertos de estas áreas quedan imposibilitados para emitir un dictamen.

Por otro lado, en los casos de identificación de restos humanos en donde la cantidad física de estos no permite la realización de una reconstrucción, el orden lógico de análisis exige el conocimiento del sexo del individuo con el fin de confrontarla con la



**encuesta realizada a los familiares que denuncian la desaparición de un individuo de sexo específico.**

**Si la información obtenida por el laboratorio coincide con la obtenida de la familia entonces se procede al estudio de los marcadores polimórficos iniciando con el locus del grupo sanguíneo y finalizando con el análisis de STR's.**

**Es patente que dentro de la metodología aplicada originalmente en la identificación de restos de origen humano, falta uno de los eslabones más importantes en la cadena de análisis: LA DETERMINACIÓN DEL SEXO GENÉTICO. Para ello es necesario optimizar e implementar la técnica con el fin de adaptarla a las condiciones del laboratorio de GENÉTICA FORENSE DE LA P.G.J.D.F.**

**La realización de este proyecto repercutirá positivamente en la Optimización de costos y tiempo invertido en el análisis de la evidencia.**

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL. :**

Optimizar la técnica de PCR para la determinación de sexo genético y aplicarla en el laboratorio de genética forense.

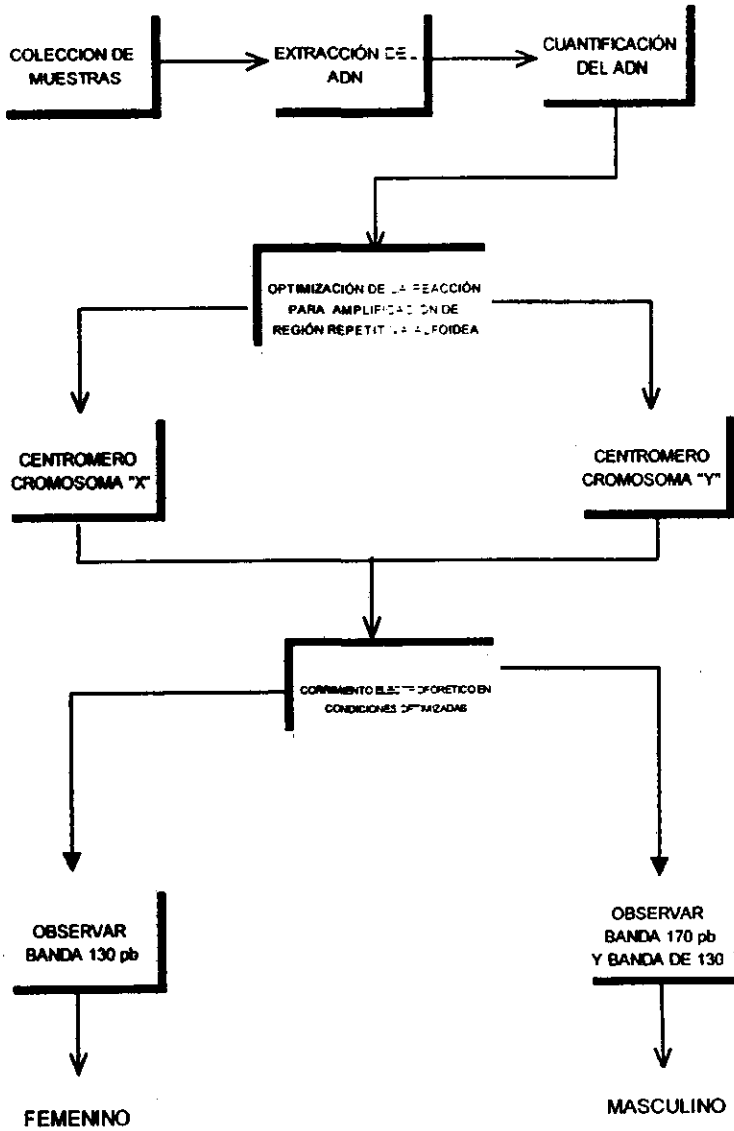
### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS. :**

- Extraer ADN genómico de muestras de evidencias biológicas. :
  - a) Sangre entera.
  - b) Manchas de sangre.
  - c) Hueso.
  - d) Piel.
  - e) Músculo.
  - f) Cabello.
- Purificar el ADN extraído de las muestras biológicas con resina de intercambio ionico.
- Cuantificar el ADN extraído.
- Optimizar la técnica de PCR para la determinación de sexo según protocolos de *biología molecular*
- Identificar banda de 170 pb específica de cromosoma Y en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio e irradiados con luz ultravioleta.
- Identificar banda de 130 pb específica de cromosoma X en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio e irradiados con luz ultravioleta.

## **HIPÓTESIS**

**La amplificación de la región centromérica alfoidea de los cromosomas sexuales, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, permitirá determinar el sexo genético de muestras de origen humano identificando una banda de 130 pb para el cromosoma X, y otra de 170 pb para el cromosoma Y.**

# DIAGRAMA DE FLUJO



## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Distrito Federal.

Los materiales, reactivos, soluciones y equipos utilizados en la realización de este trabajo se encuentran referidos en el apéndice A y B.

**Población:** La población empleada en la optimización de la reacción de PCR para la determinación de sexo genético fue abierta de tipo aleatorio conformada por 210 individuos hombres y mujeres que no tenían parentesco entre si, y de esta manera validar la técnica de PCR para la determinación genética del sexo en las muestras descritas en el cuadro de abajo.

**Recolección de muestras. :** Las muestras empleadas en la realización de este trabajo se tomaron de las que ingresan al laboratorio de genética forense para que se les realizara algún estudio. De este lote total de 210 muestras de evidencias biológicas, se analizaron de la siguiente manera:

| <b>Tipo de Muestra</b>               | <b>Cantidad</b> | <b>Porcentaje (%)</b> |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Sangre Periférica                    | 122             | 58.09                 |
| Manchas hemáticas                    | 15              | 7.14                  |
| Tejido (Músculo)                     | 2               | 0.952                 |
| Cordón umbilical                     | 4               | 1.909                 |
| Hígado                               | 2               | 0.952                 |
| Pelo                                 | 3               | 1.43                  |
| Saliva                               | 15              | 7.14                  |
| Semen                                | 10              | 4.760                 |
| Semen (Hisopado Vaginal)             | 10              | 4.76                  |
| Células vaginales (Hisopado vaginal) | 10              | 4.76                  |
| Medula Ósea (Hueso fresco)           | 5               | 2.40                  |
| Hueso                                | 10              | 4.76                  |
| Piel (Oreja)                         | 2               | 0.952                 |
| <b>TOTAL:</b>                        | <b>210</b>      | <b>100%</b>           |

A cada muestra se le asignó un número omitiendo el sexo fenotípico de origen.

**Obtención y preparación de las muestras.** El ADN se extrajo de cada una de las muestras de acuerdo a los protocolos descritos en el apéndice A.

**Cuantificación de ADN.** Se aplicó la técnica de electroforesis horizontal (apéndice C), descrita por la compañía "lifecodes", se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (Gibco) con todos los aditamentos descritos en el apéndice A para el corrimiento electroforético.

**Optimización de la Reacción de PCR para la amplificación de la Región Centromérica alfoidea, de los Cromosomas X y Y.** Se partió del protocolo publicado por Michal Witt y Robert P. Erickson en *Human Genetics* (1989) 82:271-274 en el cual se determinaba sexo genético solo en aquellas muestras provenientes de manchas hemáticas preparadas previamente. En este protocolo se emplearon dos pares de oligonucleótidos cebadores: Y1, Y2 que flanquean un fragmento de 170 Pb de la región repetida alfoidea del cromosoma Y humano. (Y1: ATGATAGAACGGAAATATG; Y2 :AGTAGAATGCAAAGGGCTCC, Wolfe et al 1985), y X1, X2 que flanquean el fragmento de 130 Pb de la región repetida centromérica alfoidea del cromosoma humano X. (X1: AATCATCAAATGGAGATTT; X2 :GTTTCAGCTCTGTGAGTGAAA, (Waye y Willard 1985). Para la amplificación de las muestras en este protocolo se emplearon 30 ciclos con las siguientes características: desnaturalización a 94°C por un minuto, alineación a 55°C por 2 minutos, (para una reacción amortiguada conteniendo 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.9% de gelatina, 2.5 unidades de Taq polimerasa, 200µM de cada uno de los dNTP's y 1µmol de cada uno de los cebadores por cada 100µl de mezcla de reacción.). Como se menciona arriba, este protocolo se empleó para determinar el sexo genético de manchas hemáticas "prefabricadas" a las cuales luego se les extrajo el ADN para su posterior identificación, sin embargo, mencionaba su potencial uso en las ciencias forenses, por ello se trató de montarla en el laboratorio de genética forense y adecuarla para usarse con ADN extraído de evidencias biológicas forenses reales, las cuales como

se menciona en el texto. sufren alteraciones debido a las condiciones en las que se les encuentran, repercutiendo esto en la calidad y cantidad de ADN que se recupera de este tipo de muestras. Los resultados obtenidos en este laboratorio no fueron satisfactorios a las condiciones que mencionaba el artículo por lo que se procedió a optimizar las condiciones de reacción de PCR para muestras de tipo forense realizándose lo siguiente.

1. Extracción del ADN de las diferentes muestras biológicas. (Ver anexo).
2. Se amplificó ADN extraído de sangre entera a las condiciones descritas en el protocolo original
3. Se calculó la temperatura de alineación para cada uno de los oligonucleótidos cebadores (capítulo 4) y se comparó con la referida en el protocolo.
4. Se amplificó a esta nueva temperatura calculada y se observaron los resultados
5. Se agregaron a las condiciones de amplificación temperaturas de Pre calentamiento y extensión final.
6. Se probó el empleo de un aditivo Protéico (Albúmina Sérica Bovina), para el caso de muestras biológicas muy dañadas o que por los componentes de la extracción la amplificación resultaba infructuosa.
7. Se varió la concentración del ión Magnesio para aumentar sensibilidad y disminuir la presencia de bandas inespecíficas.
8. Se varió la concentración de dNTP's
9. Se varió la concentración de Taq polimerasa.

**Interpretación de Resultados.** La interpretación de las bandas después de la amplificación se realizó, en geles de agarosa, tomando como base las condiciones de electroforesis recomendadas para el marcador de peso molecular de 100 y 50 Pb (MPM), Apéndice C según Gibco BRL Markers & Standars.

La determinación del sexo genético se hizo al identificar dos bandas características de 130 y 170 pares de bases, una para cada cromosoma sexual (X y Y respectivamente), después del corrimiento electroforético horizontal, y posterior comparación con los marcadores de peso molecular de ADN de 100 y 50 Pb.

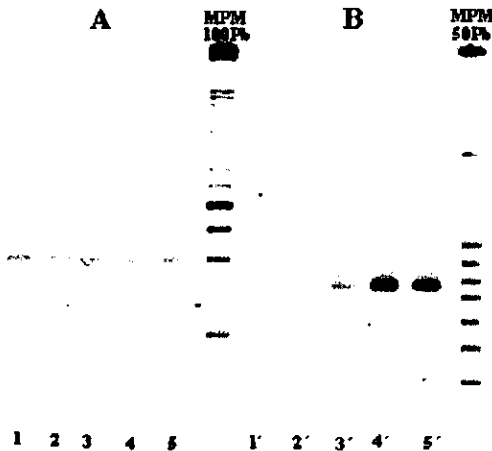
**Análisis e implementación de la Reacción Optimizada.** El análisis se hizo sobre la base de los resultados de las amplificaciones realizadas para cada una de las variaciones efectuadas, los datos se observan en las fotos de los corrimientos electroforéticos.



## RESULTADOS

### Productos de amplificación sin optimización de la reacción de PCR.

La reacción de PCR para la amplificación de regiones específicas altamente repetitivas de los cromosomas sexuales humanos X y Y, se realizó, bajo las condiciones primarias que venían dadas por el protocolo original según Michal Witt y Robert Erickson, para este primer experimento se empleó ADN de sangre entera extraída por punción venosa de individuos voluntarios (cuatro hombres y dos mujeres), en este primer ensayo (Fig.10) se pueden observar los resultados de la amplificación de estas muestras.



**FIGURA 10.** Gel de agarosa al 2.7% teñido con Bromuro de etidio, que muestra productos de amplificación a condiciones no optimizadas de PCR para centrómero de cromosoma X (carriles 1- 5) y centrómero de cromosoma Y (carriles 1'- 5').

En la figura se pueden observar que los productos de amplificación para los cromosomas X y Y (panel A y B respectivamente), no muestran claridad en los productos, ya que se esperaría observar una banda perfectamente marcada y delimitada de 130Pb para las muestras del panel A, sin embargo, y aun cuando si se observa una banda a esa altura su definición no es muy clara, por lo que se podrían cometer errores al momento de interpretar los resultados. Para el caso del cromosoma Y las bandas esperadas de amplificación deben de ser de 170Pb también perfectamente delimitadas y

marcadas, para este caso se observan que si se presentan estas bandas a excepción del carril 1' en donde se esperaba que no hubiera amplificación ya que la muestra provenía de un individuo fenotípicamente femenino. en los otros carriles si se observan bandas aunque no muy claras en 2' y 3' en donde se observan ligeramente. esto no debería de observarse ya que el ADN que se empleó para la amplificación provenía del mismo individuo masculino además de que se usó la misma cantidad de ADN para amplificar. Es patente también que en los productos de amplificación para el cromosoma Y se presentan bandas inespecíficas por encima de la banda de interés de 170Pb y esto no viene documentado en el protocolo base. para el caso del cromosoma X también se presenta una banda a la altura de 300Pb, sin embargo, esto se encuentra reportado en el protocolo como una banda inespecífica que acompaña a los productos de amplificación del centrómero de X, se hace la mención también de que no es relevante, ya que no presenta ningún problema al momento de hacer la interpretación del resultado.

Con estos resultados se puede observar que las condiciones del protocolo original no eran óptimas para el laboratorio de Genética Forense, además de que, en otros ensayos para amplificar estas mismas regiones se empleó ADN de muestras de evidencias forenses (saliva, hueso, tejido, etc.), y no se obtuvo ningún resultado en la amplificación, es decir no se presentaron en ninguno de los casos bandas específicas de 130 y 170 pares de bases

Tomando en cuenta que para las condiciones descritas inicialmente las muestras de sangre con un gran contenido de ADN presentaban productos de amplificación muy tenues y que el ADN de otras muestras biológicas no amplificaban se procedió a modificar las condiciones iniciales para optimizar la reacción y hacerla extensiva a cualquier tipo de muestra.

## OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE PCR

### OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ALINEACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES X1, X2 y Y1, Y2.

El éxito en la amplificación de PCR requiere de una gran atención en diferentes parámetros que afectan el rendimiento de la reacción y que traen como consecuencia un bajo rendimiento en los productos, la amplificación de regiones carentes de interés, o bien que no se realice la amplificación. Uno de estos parámetros que resultan determinantes en el éxito de la amplificación, es la temperatura de alineación de los oligonucleótidos cebadores (ver capítulo 4.0), por ello se procedió a recalcular la temperatura de alineación de los cebadores y compararla con la que recomendaba el protocolo inicial, la temperatura de alineación se calculó empleando la fórmula que se da en el capítulo 4.0.

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Para el par de cebadores de X:

**X1:**

$$T_m = 2 \times (8 + 6) + 4 \times (5 + 2)$$

$$T_m = 56^\circ\text{C}$$

**X2:**

$$T_m = 2 \times (5 + 6) + 4 \times (6 + 3)$$

$$T_m = 56^\circ\text{C}$$

Para el par Y1, Y2:

**Y1:**

$$T_m = 2 \times (9 + 4) + 4 \times (5 + 1)$$

$$T_m = 50^\circ\text{C}$$

**Y2:**

$$T_m = 2 \times (7 + 3) + 4 \times (6 + 4)$$

$$T_m = 60^{\circ}\text{C}$$

Temperatura promedio del par de oligonucleótidos cebadores Y1, Y2

$$T_{m\text{Promedio } X1, X2} = 55^{\circ}\text{C}$$

La temperatura de alineación empleada en el protocolo base es de  $55^{\circ}\text{C}$  por un minuto, la cual coincide con la que se determinó arriba, sin embargo, como se refiere en el capítulo 4.0 a esta temperatura se le puede variar 5 grados centígrados por abajo o por arriba del promedio del par de cebadores, por ello se probó un nuevo ensayo de amplificación en el cual se modifica lo siguiente:

**Condiciones de amplificación original:**

30 ciclos de amplificación a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $55^{\circ}\text{C}$  de temperatura de alineación por 30 segundos, y una temperatura de extensión de  $72^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos.

**Modificación de las condiciones del termociclador**

5 minutos iniciales a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 ciclos de amplificación a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $50^{\circ}\text{C}$  de temperatura de alineación por 30 segundos, y una temperatura de extensión de  $72^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos. después de estos 30 ciclos se sigue un periodo de extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. (Fig.11)

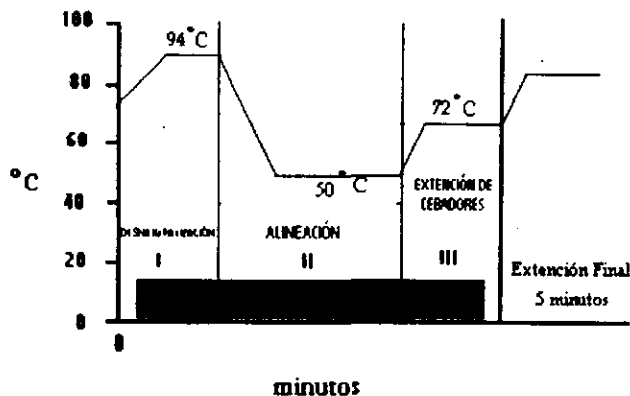


Figura 11.0  
Pasos en los ciclos de PCR

Después de modificar la temperatura a 50°C, se metieron a amplificar muestras de ADN extraídas de sangre, obteniéndose para estas nuevas condiciones los siguientes resultados:

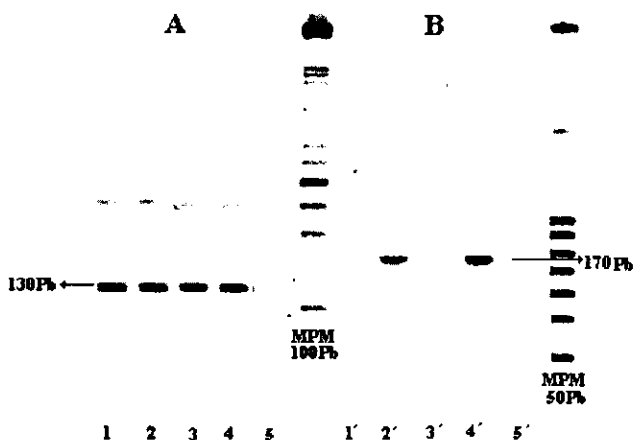


FIGURA12. Gel de agarosa al 2.7%, teñido con Bromuro de etidio, que muestra el resultado de la amplificación para la identificación del sexo, después de modificada la temperatura a 50°C. (Panel A Centrómero de Cromosoma X, Panel B Centrómero de Cromosoma Y). Las muestras 1 y 1' son de origen femenino y la 2 y 2' son de origen masculino.

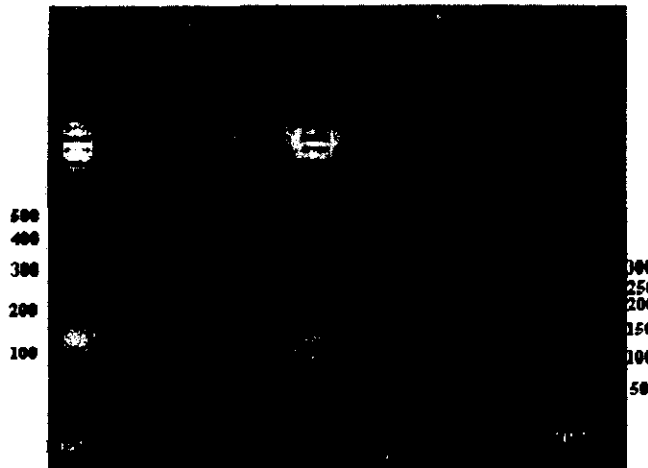
Las muestras amplificadas bajo las nuevas condiciones de temperatura ensayadas, muestran una mayor eficiencia en los resultados, ya que como se puede observar en la figura 12.0. los fragmentos de interés para determinar el sexo de origen de la muestra, se presentan bien claros y definidos para todas las muestras amplificadas (Panel A carriles 1- 5 y Panel B carriles 1' - 5'), para este ensayo se utilizaron cuatro muestras de individuos diferentes de sexo conocido (dos masculinos y dos femeninos). Al hacer la interpretación de resultados se determinó lo siguiente: todas las muestras que se amplificaron con el par de oligonucleótidos cebadores para el centrómero del cromosoma X presentan una banda característica de 130 Pb específica para el cromosoma X (panel A carriles 1, 2, 3 y 4), y solo dos de estas mismas muestras presentan banda después de emplear el par de oligonucleótidos cebadores para el centrómero del cromosoma Y (panel B carriles 2' y 4'). Los resultados de este ensayo se corroboraron por que las muestras 5 y 5' se usaron como controles de amplificación ya que contenían todos los reactivos a excepción de ADN, de esta manera se comprueba que las bandas observadas corresponden a productos de amplificación de los fragmentos esperados para cada uno de los cromosomas humanos y no como resultados de la interacción entre los mismos cebadores, además de que al no presentarse ningún tipo de banda en estos carriles se confirma que los reactivos y la preparación de los tubos de reacción, no presentan contaminación por ADN humano.

La modificación de la temperatura de alineación a 50°C, además de aumentar un tiempo inicial de 5 minutos de desnaturalización y un tiempo extra de extensión final de 5 minutos, aumentó la eficiencia de la reacción para cada uno de los pares de oligonucleótidos cebadores

Después de verificar que bajo estas condiciones los resultados de la amplificación para muestras sanguíneas seguían siendo repetitivos en todos los ensayos realizados (122 muestras), se procedió a amplificar ADN extraído de muestras diferentes a sangre entera (hueso, piel, saliva, manchas hemáticas, cordón umbilical, pelo, medula ósea, etc.). Las cuales presentan cierto grado de degradación dadas las condiciones en las que se encuentran y envían al laboratorio, para que se les realicen pruebas genéticas (ver capítulo 1.0). De esta manera se analizara la eficiencia de la reacción de PCR para

determinar sexo en muestras de ADN extraído por métodos que emplean mayor cantidad de reactivos y cuya recuperación de ADN es muy pobre en cantidad y calidad.

Para el siguiente ensayo se empleó ADN extraído de muestras de evidencias forense, tales como hueso, manchas hemáticas secas y medula ósea. se empleó también en cada ensayo controles masculinos y femeninos cuyo sexo genético se había determinado previamente con esta misma reacción de PCR, obteniéndose para estos casos los siguientes resultados:



**FIGURA 13.** Gel de agarosa que muestra resultado de la amplificación para determinar sexo genético de muestras de evidencias forenses. Las muestras fueron amplificadas a la temperatura optimizada de 50°C, para cada par de cebadores se utilizaron controles femeninos y masculinos (Panel A carriles 1 y 2, panel B carriles 1' y 2' respectivamente). Carril 3 y 3' ADN de hueso, carril 4 y 4' ADN de manchas hemáticas secas

El orden que siguen las muestras en la Figura 13 es: carril 1 y 1' control femenino (ADN de sangre entera), carril 2 y 2' control masculino (ADN de sangre entera). Para el panel A, se empleó el par de cebadores X1, X2 que amplifica un fragmento específico de 130Pb del centrómero del cromosoma sexual X humano, y para el panel B se empleó, el par de cebadores Y1, Y2 que amplifica un fragmento específico de 170Pb del centrómero del cromosoma sexual Y. Las muestras problema se acomodaron en el siguiente orden carril 3 y 3' fue de ADN extraído de hueso, carril 4 y 4' ADN extraído de manchas hemáticas, los carriles 5 y 5' contienen a los "blancos" los cuales contienen

todos los componentes de la reacción a excepción de ADN, y los cuales nos proporcionan información acerca de si existe algún tipo de contaminación en los reactivos o al momento de preparar la mezcla de reacción.

Con los resultados que se observan en la foto del gel teñido después de la electroforesis horizontal, nos damos cuenta de que la reacción de amplificación presenta productos para todas las muestras del Panel A (carriles 1 al 5), no así en el panel B correspondiente al par de cebadores del centrómero del cromosoma Y donde solo se observa una banda de 170 Pb y que corresponde al control masculino de ADN de sangre entera. En los carriles 1', 3' y 4', no se observan bandas para la muestra del carril 1' la falta de banda de 170 Pb es correcto ya que corresponde al control femenino, cuyo genotipo carece del cromosoma Y (Genotipo XX). En los otros carriles la falta de banda sería indicativo de que las muestras provienen de individuos femeninos, sin embargo, se conocía que el sexo (fenotípico) de estas muestras era de origen masculino por lo que la reacción de amplificación para el centrómero del cromosoma Y, presenta problemas al momento de utilizar ADN de muestras cuyo ADN se encuentra muy degradado o en muy poca cantidad.

La amplificación de todas las muestras del panel A correspondientes al Cromosoma X, nos sirvió de indicativo de que algo estaba sucediendo y que inhibía la reacción para el centrómero del cromosoma Y, además de que se tiene como antecedente de que el ADN extraído de hueso, piel, médula, manchas hemáticas, pelo etc. presentan problemas para la amplificación de los otros marcadores genéticos empleados en el laboratorio de genética forense (HLA DQ $\alpha$ , POLYMARQUER, DIS80, y Grupo sanguíneo), es por ello y además de que se observaron productos de amplificación para X, que se penso en agregar un componente extra que resolviera el problema de inhibición de la reacción de PCR.

Un componente extra en la mezcla de reacción que se sugiere como capaz de resolver los problemas de inhibición de la reacción de amplificación ya sea, por componentes endógenos del mismo material biológico, o por reactivos empleados en la extracción del ADN para este tipo de muestras es la adición de **Albúmina Sérica Bovina (ABS)**, la cual actúa como matriz secuestrante de contaminantes endógenos (policatiónica),



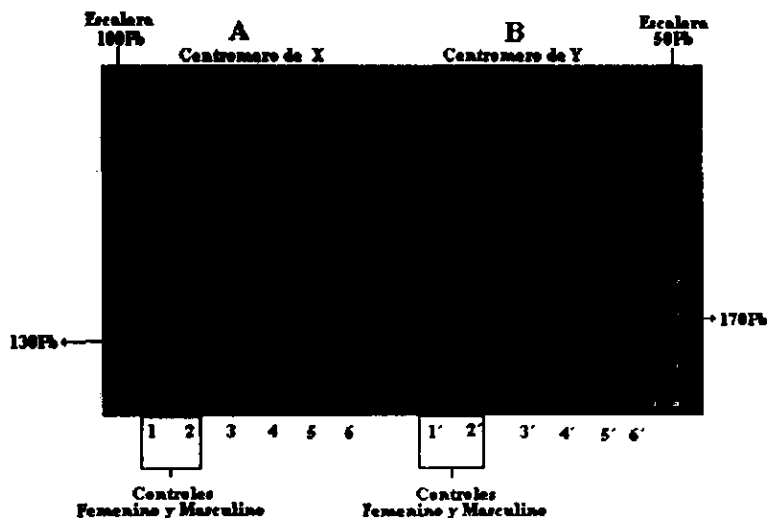
potenciando la especificidad y aumentando la sensibilidad de la reacción en muestras cuyo ADN se encuentra muy degradado o en muy poca cantidad.

Para probar lo siguiente se preparó una solución madre de ABS de tal manera que cada microlitro de solución tuviera  $1\mu\text{g}$  de ABS.

La cantidad óptima de ABS para muestras forenses se reporta como de  $16\mu\text{g} / 100\mu\text{l}$  de mezcla de reacción, por lo que para nuestro estudio empleamos  $8\mu\text{g} / 50\mu\text{l}$  de reacción.

Se probó en este ensayo la actividad potenciadora de la ABS en reacción de PCR para muestras forenses (Hueso, pelo, piel, manchas secas, tejido momificado, médula ósea, etc.).

Este ensayo se desarrollo bajo las condiciones de temperatura de alineación ya determinadas incluyendo únicamente la solución de ABS en la mezcla de reacción para amplificar Centrómero de X y Centrómero de Y. Obteniéndose los siguientes resultados. :



**FIGURA 14.** Gel de agarosa al 2.7%, mostrando el efecto de la adición de ABS ( $8\mu\text{g}/50\mu\text{l}$  de reacción) a la mezcla de reacción en muestras de ADN extraídas de Muestras de evidencias forenses. Carril 3 y 3' ADN de Hueso (fémur), carril 4 y 4' tejido momificado (piel de brazo), carril 5 y 5' medula de hueso fresco (fémur). Carril 6 y 6' Muestras blanco. (Para la extracción de ADN de estas muestras ver Apéndice).

Los resultados de la amplificación después de adicionar la ABS. muestran la efectividad de este componente para amplificar ADN de muestras anteriormente no amplificaban. esto por la presencia de inhibidores endógenos de las muestras. o bien. por que para la extracción de estos ADN se utilizan reactivos que pueden interferir en la amplificación del fragmento de interés.

**Tabla 9**  
**Resultados de la Amplificación FIGURA 14.0**

| Muestra (Carril)                        | Par de cebadores X1, X2 | Par de Cebadores Y1, Y | Sexo Genético    |
|---|-------------------------|------------------------|------------------|
|   | Banda observada         | Banda observada        |                  |
| <b>Carril 1 y 1' (Control Femenino)</b> | Banda de 130 Pb         | Sin banda              | <b>Femenino</b>  |
| Carril 2 y 2' (Control masculino)       | Banda de 130 Pb         | Banda de 170Pb         | <b>Masculino</b> |
| Carril 3, 3' (Fémur)                    | Banda de 130 Pb         | Banda de 170Pb         | <b>Masculino</b> |
| Carril 4, 4' (tejido momificado)        | Banda de 130 Pb         | Banda de 170Pb         | <b>Masculino</b> |
| Carril 5, 5' (Medula ósea)              | Banda de 130 Pb         | Banda de 170Pb         | <b>Masculino</b> |
| Carril 6, 6' (muestras blanco)          | Sin banda               | Sin banda              |                  |

Los resultados de posteriores ensayos mostraron que para todos los casos que se trabajaron, la reacción fue siempre repetitiva, proporcionándonos el sexo de origen de la evidencia del cual se extrajo el ADN.

Con lo anterior se determina que la adición de ABS a la mezcla de Reacción para amplificar la región centromérica alfoide de los cromosomas sexuales humanos, corrige la inhibición de la reacción de PCR, cuando se emplea ADN extraído de muestras forenses.

Una vez que se hubo optimizado la Temperatura de Alineación de los oligonucleótidos cebadores empleados en este estudio y corregido los problemas de inhibición de la reacción, solo faltaba optimizar la concentración de  $MgCl_2$  y observar el efecto de la

variación en la concentración de este ion, así como, la de los dNTP's y la Taq polimerasa, en los productos de amplificación.

### **Optimización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>**

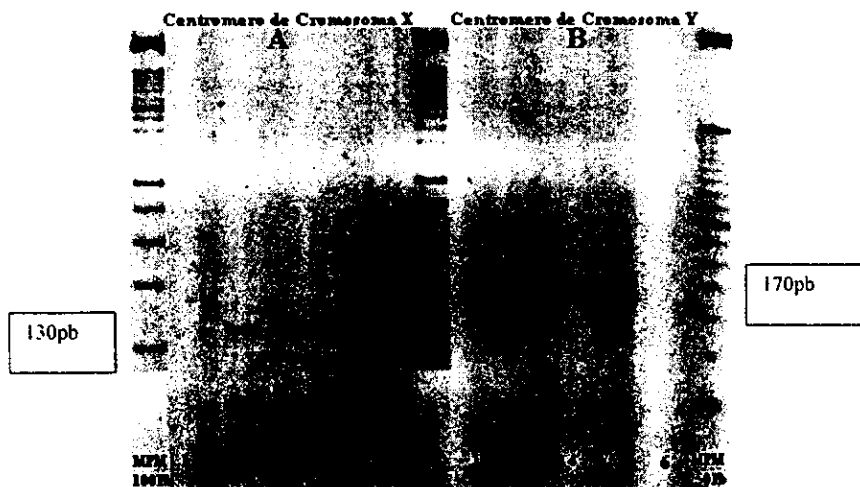
#### **Efecto de la variación en la concentración de MgCl<sub>2</sub> en los productos de amplificación**

Esta demostrado que la variación de la concentración del ion magnesio altera de manera determinante la especificidad de la reacción de PCR y que concentraciones elevadas de Mg<sup>2+</sup> promueven la amplificación de regiones inespecíficas, es por esto, que, aun cuando la reacción de PCR para la determinación genética del sexo nos proporciona resultados reales, se evalúa el efecto que se produce en nuestra reacción al modificar la concentración de este ión. Se busca además eliminar la banda inespecífica que acompaña a los productos de PCR de la región centromerica alfoidea; para ello se ensaya lo siguiente:

La variación de la concentración del ion Mg<sup>2+</sup> se hizo como sigue:

| <b>MUESTRA<br/>(Carril)</b> | <b>CENTRÓMERO DE X</b>                                   | <b>CENTRÓMERO DE Y</b>                             |
|-----------------------------|--|--|
|                             | <b>Concentración de ion Mg<sup>2+</sup><br/>(mMolar)</b> | <b>Concentración de ion Mg<sup>2+</sup><br/>mM</b> |
| <b>1</b>                    | <b>0.5</b>   | <b>0.5</b>   |
| <b>2</b>                    | <b>1.5</b>   | <b>1.5</b>   |
| <b>3</b>                    | <b>2.0</b>   | <b>2.0</b>   |
| <b>4</b>                    | <b>2.5</b>   | <b>2.5</b>   |
| <b>5</b>                    | <b>3.5</b>   | <b>3.5</b>   |

Obteniéndose los siguientes resultados:



**FIGURA 15. Optimización de la concentración del ion magnesio y su efecto en los productos de amplificación de la región centromérica de los cromosomas sexuales X y Y. Las concentraciones evaluadas de cloruro de magnesio son 0.5, 1.5, 2, 2.5, y 3 mMol, respectivamente para los carriles del panel A y B.**

En la Figura 15, se muestra el resultado de la optimización de la concentración de  $MgCl_2$  y la evaluación de su efecto a diferentes concentraciones. Para el panel A como se puede ver en la ilustración la reacción de amplificación se ve inhibida a bajas concentraciones de este ion (1.0 a 0.5 mMolar), y que al igual que como se reporta en los protocolos de biología molecular el aumento en la concentración  $MgCl_2$  se ve reflejado en el rendimiento y especificidad de la reacción (amplificación de regiones inespecíficas), esto se observa en nuestro estudio al emplear concentraciones de este ion de 2.5, y 3.0 mMolar, es por ello que la concentración óptima de  $MgCl_2$  para nuestra reacción es de 2.0mMolar.

Para el panel B se analiza el efecto de las mismas concentraciones de  $MgCl_2$ , para determinar la concentración óptima de este ion y evaluar el efecto en los productos de amplificación. Los resultados muestran que no existe un efecto aparente en el rendimiento y especificidad de la reacción a las diferentes concentraciones que se evaluaron ya que como se puede observar no existe inhibición de la reacción, ni existen amplificaciones de regiones inespecíficas. Con base en los resultados de este estudio

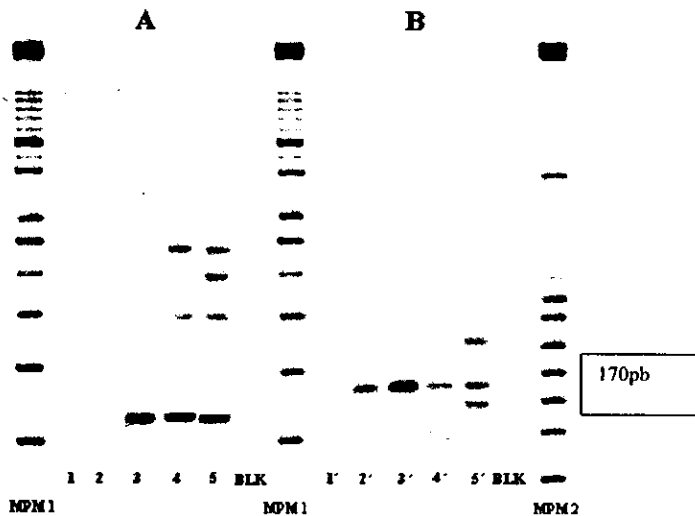
podemos decir que la concentración óptima de  $MgCl_2$  para amplificar la región centromérica del cromosoma Y, es de 2.0mmolar.

Otro factor determinante de la calidad, especificidad y rendimiento de la reacción de PCR, es la concerniente a la cantidad de Taq ADN polimerasa, que se emplea al momento de amplificar las muestras, es por ello que aquí también evaluamos el efecto de la concentración de Taq ADN polimerasa en la reacción de PCR para la determinación genética de sexo.

Para esta evaluación se hizo lo siguiente:

| MUESTRA<br>(Carril) | CENTROMERO DE X                | CENTROMERO DE Y                |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                     | Unidades de Taq ADN polimerasa | Unidades de Taq ADN polimerasa |
| 1                   | 0.5                            | 0.5                            |
| 2                   | 1.5                            | 1.5                            |
| 3                   | 2.0                            | 2.0                            |
| 4                   | 2.5                            | 2.5                            |
| 5                   | 3.5                            | 3.5                            |

El resultado de este ensayo se muestra en la siguiente figura:



**Figura 16. Resultados de la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de Taq ADN polimerasa.** Las concentraciones evaluadas de Taq ADN polimerasa son 1.0, 1.5, 2.5, 3.5, 4.0 Unidades, para X y Y respectivamente.

El efecto de las diferentes concentraciones de Taq polimerasa se observan en la figura 16, podemos deducir que para el cromosoma X (panel A), la cantidad en unidades que presenta mejores rendimientos para la reacción es la de 2.5 U de Taq ADN polimerasa ya que la banda específica de 130Pb característica del centrómero del cromosoma X, se observa bien marcada y delimitada sin presencia de bandas inespecíficas. no así para concentraciones menores (de 0.5 a 1.5 U) donde la reacción no se realiza. En el caso de concentraciones mayores a la óptima (3.5 a 4.5 U) el rendimiento decae de manera notable, además de que la reacción se hace inespecífica y se comprueba por la gran cantidad de bandas inespecíficas producidas durante la amplificación.

Para el caso del cromosoma Y se presenta el mismo caso. La concentración que se presenta como óptima para su amplificación es la de 2.5 U, en tanto que, la reacción se inhibe por debajo de esta (1 a 1.5U), y se hace menos específica a concentraciones elevadas (3.5 a 4.0 U).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La optimización de las condiciones de reacción de PCR, resultó exitosa para la determinación genética del sexo de origen de muestras de evidencia forense, además, de que se pudo evaluar el efecto de los principales factores que determina el éxito de la reacción de PCR. Para este fin se emplearon las estrategias convencionales, referidas en los protocolos de PCR, para la optimización de la reacción, de esta manera se lograron determinar las condiciones óptimas necesarias para la amplificación de las secuencias específicas de la región alfoide de los cromosomas sexuales humanos X y Y, de 130 y 170pb respectivamente, además de que con la optimización se incrementó de manera apreciable el rendimiento de la reacción, comparado con los que se obtienen bajo las condiciones normales descritas en el protocolo original por Witt y Erickson.

Además con este proceso de optimización empleado, se examinaron los efectos de componentes específicos que dirigen la reacción. El  $MgCl_2$  se muestra como factor determinante en la eficiencia y especificidad de la reacción ya que altera la cinética de la asociación y disociación del dúplex formado por los Cebadores-ADN patrón a las temperaturas de alineación y extensión. Este componente también está involucrado en la alteración de la eficiencia ya que la polimerasa reconoce y extiende estos Dúplex. La concentración del Ion magnesio requerida para una óptima amplificación depende en gran medida de la secuencia de bases del patrón de ADN a amplificar y de los cebadores empleados. Un exceso en la concentración de  $MgCl_2$  en la mezcla de reacción, resulta en una acumulación de productos inespecíficos de amplificación y por lo tanto un decremento en los productos deseados. Los deoxinucleótido trifosfato se enlazan cuantitativamente al  $Mg^{2+}$ , por lo que cualquier modificación en la concentración de dNTP's requiere de un ajuste compensatorio en la concentración de  $MgCl_2$ . Es esencial que la optimización de la reacción se haga de manera individual ya que no-solo se reduce la amplificación de artefactos, sino que también se incrementa el rendimiento de la reacción al disminuir la competencia de los cebadores y nucleótidos. Los resultados obtenidos en la amplificación de la región alfoide de los cromosomas sexuales muestran que a las condiciones normales descritas en el protocolo inicial de Witt y Erickson los resultados de la amplificación solo eran satisfactorios para las muestras de ADN extraídas de sangre entera por punción venosa y ADN de semen o

saliva en donde la calidad y cantidad del ADN recuperado es muy alta, sin embargo, en la practica rutinaria del laboratorio de genética forense el tipo de muestras susceptibles de identificación que ingresan son generalmente hueso, piel, manchas hemáticas o algún otro tipo de tejido las cuales, en la mayoría de los casos las condiciones en las que se encontraron inciden directamente en la calidad y cantidad del ADN recuperado en este tipo de muestras, en estos casos las condiciones normales descritas inicialmente no permitían una identificación sexual, ya que la reacción de PCR no presentaba productos de amplificación. De esta manera se inició el proceso de optimización de la reacción de PCR para incrementar el rendimiento y especificidad de reacción y con ello implementarla a las condiciones de trabajo del laboratorio de genética forense.

En el primer caso de optimización se partió del hecho de que las condiciones iniciales sólo permitían la amplificación de sangre entera y manchas hemáticas prefabricadas con sangre fresca, se amplificaron este tipo de muestras y se observó que los productos de amplificación eran muy tenues (muy baja concentración de productos), por lo cual se procedió a recalcular la temperatura de alineación de los cebadores. Una vez realizado el cálculo se observaron los resultados a esta nueva temperatura de alineación, además de que se aumentó una temperatura inicial de desnaturalización y otra final de extensión para aumentar la eficiencia de la incorporación de los dNTP's. Con esta modificación de la temperatura de alineación se observó un aumento en la especificidad de la reacción ya que los productos de amplificación aumentaron en intensidad (concentración) al momento de observarlos en el gel. Una vez que se optimizó la temperatura se analizaron los resultados pero ahora para muestras de tipo forense en los cuales las características del ADN se encuentran en la mayoría de los casos limitadas, por factores ambientales que inciden directamente en su calidad. Los resultados obtenidos mostraron (Fig. 13) que para esto tipo de evidencias forenses sólo se obtenían resultados para la región específica de 130pb correspondientes al cromosoma X, no así, para el cromosoma Y donde no se presentaban productos de amplificación. Se pensó entonces que algo inhibía la reacción para este cromosoma por lo que se intentó optimizar la reacción empleando un aditivo protéico (matriz policationica), capaz de atrapar inhibidores endógenos de la muestra o bien componentes remanentes del proceso de extracción del ADN, el componente empleado para este fin fue la albúmina



sérica bovina (ABS), la cual está referida como un aditivo capaz de resolver los problemas de inhibición de reacción. Se preparó una solución maestra la cual contiene 1µg por cada µl de solución, de la cual se agrega a cada tubo de reacción 8µl/50µl de reacción. Una vez realizado esto se procedió a analizar los resultados con este nuevo componente mostrando un efecto realmente sobresaliente al agregar la albúmina ya que la reacción de amplificación producía bandas de concentración elevada para el fragmento de 170pb específico del cromosoma Y. Cabe mencionar que este componente también se agregó a la reacción del cromosoma X, en donde se observa que también tiene un efecto potenciador de la reacción. Para evaluar estos efectos se emplearon muestras de evidencias forenses tales como hueso, tejido momificado, médula ósea etc.

Una vez salvado los problemas anteriores se procedió a optimizar las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y de Taq ADN polimerasa y también para evaluar el efecto de la variación de la concentración y como inciden en los resultados.

Los resultados de la optimización de la reacción de PCR, demuestran que altas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> promueven la amplificación de artefactos inespecíficos (Fig.15), sin embargo, para la amplificación de la región específica del cromosoma Y, no se observa un efecto de este tipo ya que se presenta el producto de amplificación esperado a todas las concentraciones empleadas del ion. No existe posibilidad de que esto no sea correcto ya que todos los experimentos de optimización se repitieron cuatro veces por lo menos y en cada uno de estos se corrió una muestra blanco la cual contenía la mezcla de reacción pero sin ADN, y aquí no se presentó en ninguno de los casos productos de amplificación.

En el caso de la reacción para el cromosoma X, se encuentra referida la presencia de una banda inespecífica a la altura de 300pb, esta banda se presentó en todos los experimentos realizados en este trabajo y no pudo eliminarse a ninguna de las concentraciones probadas de MgCl<sub>2</sub> o Taq Polimerasa.

La disminución en la temperatura de alineación suele ser causa de la amplificación de dímeros, lo cual se puede solucionar ajustando la disponibilidad de Mg<sup>2+</sup> para aumentar la probabilidad de amplificar la región deseada.

ESTAS TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El otro factor que se evaluó fue la concentración de Taq ADN polimerasa, en donde el análisis se resume a un decremento de la especificidad y rendimiento de la reacción a bajas concentraciones, pasando por una meseta en donde los productos de interés son claros y concentrados para después decaer bruscamente la especificidad con producción de artefactos de amplificación (presencia de bandas inespecíficas).

En este estudio los valores óptimos para cada uno de los componentes evaluados fueron elegidos con base en la mayor concentración de productos analizadas en el corrimiento electroforético y la menor cantidad de reactivo empleado en la reacción así como los costos que implicaba una mayor cantidad.

Con la realización de este trabajo la reacción de PCR para la determinación de sexo queda completada y optimizada, para aplicarla como un marcador complementario de las pruebas genéticas que se realizan en el laboratorio de Genética Forense de la P. G. J.

D.F

## CONCLUSIONES

Con la realización de este trabajo, la reacción de PCR para la determinación de sexo queda completada y optimizada, para aplicarla como un marcador genético importante en las pruebas de identificación criminalística que se realizan en el área forense.

Con los resultados obtenidos de este estudio se obtienen las siguientes conclusiones:

- La técnica de PCR aplicada a la determinación del sexo genético, en muestras de evidencias forenses, queda implementada y optimizada para las condiciones del laboratorio de Genética Forense de la P. G. J. D. F.
- Las condiciones resultantes óptimas, para esta técnica aplicada a muestras forenses se dan a continuación:

|                         | Concentración                                   | Temperatura Optimizada* | Número de Ciclos* |
|-------------------------|---|-------------------------|-------------------|
| <b>Cebadores</b>        | <b>100<math>\mu</math>M/50<math>\mu</math>l</b> | <b>50°</b>              | <b>-</b>          |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | <b>2.0 mM</b>                                   | <b>50°</b>              | <b>-</b>          |
| <b>Taq polimerasa</b>   | <b>2.5 Unidades</b>                             | <b>50°</b>              | <b>-</b>          |
| <b>ABS</b>              | <b>8<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>l</b>     | <b>50°</b>              | <b>-</b>          |
| <b>Número de Ciclos</b> | <b>-</b>  | <b>50°</b>              | <b>35*</b>        |

\*Termociclador Perkin-Elmer Modelo 9600.

- La temperatura de alineación para los pares de cebadores de los cromosomas X y Y se recalculó para producir productos de amplificación esperados en muestras de evidencias forenses, la cual se muestra en el cuadro de arriba.
- La adición al programa del termociclador de una temperatura de precalentamiento 94° por 5 minutos y otra de extensión final a 72° por 5 minutos, incide directamente en los productos de amplificación, obteniéndose así la optimización de las condiciones de ciclaje.

- La adición de albúmina sérica bovina (ABS) a la mezcla de reacción arrojó resultados sorprendentes en la amplificación de las regiones específicas alfoideas de los cromosomas X y Y humanos, esto por que al ser una proteína potencia la actividad polimerizadora de la Taq pol que también es una proteína, entendiéndose esto por el hecho de que la enzima Taq Pol es una proteína y esta trabaja mejor en un ambiente proteico el cual es proporcionado al adicionar albúmina a la mezcla de reacción.
- Con la optimización realizada en este estudio para la reacción de PCR, se pueden obtener resultados de amplificación de las secuencias específicas alfoide de los cromosomas X y Y, de cualquier muestra biológica de evidencia forense con fines de identificación de las que ingresan al laboratorio de Genética Forense de la P. G. J. D. F.
- Se ha demostrado también con este estudio la optimización de la reacción para adecuarla al tipo de muestras que ingresan al laboratorio de genética forense de la P. G. J. D. F. además de implementarla a las condiciones de trabajo de este laboratorio forense.

## PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Aun cuando esta técnica no presenta problemas para la interpretación de los resultados es conveniente señalar que todo el proceso de preparación de los tubos de reacción se hizo a temperatura ambiente y usando Taq ADN polimerasa estándar (Perkin-Elmer®), por lo que se propone el uso de las nuevas enzimas polimerasa disponibles en el mercado (Taq Gold®, Taq Platinum®, etc.), las cuales son derivadas de la Taq ADN polimerasa recombinante y que tienen enlazado un inhibidor termolábil que contiene un anticuerpo monoclonal en la Taq ADN polimerasa. Este inhibidor previene la actividad polimerizadora de la enzima durante la preparación de la mezcla de reacción y el inicio de la reacción. Esta enzima se activa solo hasta el paso inicial de desnaturalización de la PCR, se libera el inhibidor y se activa la Taq polimerasa. De esta manera se provee un método efectivo y automático para el control de productos inespecíficos y con esto eliminar la banda inespecífica que se presenta al amplificar al cromosoma X. Existen artículos que refieren también que el uso de este tipo de enzima polimerizadora, aumenta la especificidad y rendimiento de la reacción lo cual implica que se requeriría menos cantidad de ADN para que se realice la amplificación.

## ANEXOS

### APENDICE A

#### MATERIAL.

- Pipetas automáticas de 20, 200, 1000  $\mu$ l
- Agitador orbital
- Agitador vortex
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza semi analítica
- Barra magnética
- Baño agitador con temperatura
- Microcentrifuga
- Guantes de látex estériles
- Horno de microondas
- Gradilla
- Hibridizador Techne
- Incubadora
- Marcador indeleble
- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 mL
- Matraces volumétricos de 50, 100, 250, 500 ml
- Mechero Bunsen
- Hojas de bisturi
- Moldes y peines para preparación de geles de agarosa.
- Parrilla de calentamiento con agitación magnética
- Potenciometro con electrodo de calomel
- Pipetas Pasteur
- Papel parafilm
- Placas de microtitulación
- Probetas graduadas de 50, 100, 250, 500 1000ml
- Refrigerador

- Tubos Falcon de 50 ml con tapa
  - Tubos eppendorf de 1.5ml
  - Vasos de precipitados de 125, 250, 500 y 1000ml
  - Puntas para pipetas esterilizadas y con filtro.
  - Estuches de extracción con aplicación forense.
    - a) *ReadyAmp Genomic DNA Purification System.*
    - b) *Wizard® Genomic DNA purification Kit*
  - Agarosa Grado electroforético
  - Cámara de Electroforesis Horizontal
  - Fuente de poder para electroforesis.
  - Bromuro de Etidio.
  - Transiluminador de Rayos UV, con Cámara Fotográfica y Monitor (EAGLE EYE®).
  - Amortiguador de Reacción para PCR
  - dNTP's
  - Cebadores X1, X2. y Y1, Y2
  - MgCl<sub>2</sub>
  - Taq Polimerasa
  - Agua Estéril.
  - Albúmina sérica bovina (BSA).
  - Termociclador Gene Amp PCR System 9600 de PERKIN ELMER.
  - Marcador de peso molecular de 100 pares de bases.
  - Marcador de peso molecular de 50 pares de bases.
  - Amortiguador TAE 50X
  - Solución Sacarosa-Tritón 2X.
- Tubos MicroAmp (Tubos de reacción con tapa 0.2 mL), para amplificación en Termociclador 9600 de Perkin-Elmer.

## **REACTIVOS**

**Acido Clorhidrico**  
**Agarosa grado electroforético**  
**Agua deionizada estéril**  
**Amortiguador de lisis celular**  
**Amortiguador de precipitación de proteínas**  
**Amortiguadores de pH 4.0, 7.0 y 10.0**  
**Azul de bromofenol**  
**Bromuro de etidio**  
**Cloruro de magnesio**  
**Cloruro de sodio**  
**Ditiotreitol (DTT)**  
**Duodecil sulfato de sodio**  
**EDTA**  
**Estándares de ADN de 5, 10, 100 y 200 ng**  
**Etanol**  
**Glicerol**  
**Hidróxido de sodio**  
**ris-HCl**



## APENDICE. B

### PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN Y ELECTROFORESIS.

#### Extracción de ADN de Sangre Entera (300µl).

1. En un tubo estéril de microcentrifuga de 1.5ml, agregar 900µl de solución amortiguadora de lisis celular (*Cell Lysis*).
2. Transfiera 300µl de sangre al tubo anterior que contiene la solución de lisis. Mezcle la sangre con el reactivo por inversión del tubo de 5-6 veces.
3. Incube la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente (invierta el tubo 2-3 veces durante la incubación) para lisar las células rojas de la sangre. Centrifugar por 20 segundos a máxima velocidad a temperatura ambiente.
4. Remueva y descargue todo el sobrenadante posible sin remover el botón blanco del fondo.
5. Mezcle en *Vortex* el tubo vigorosamente hasta que las células blancas se resuspendan (10-15 segundos).

Nota: Para obtener una lisis celular eficiente, es esencial que las células blancas estén completamente resuspendidas.

6. Agregar 300µl de Amortiguador de lisis nuclear (*Nuclei Lysis Solution*) al tubo que contiene las células resuspendidas. Invierta el tubo unas 5-6 veces para lisar las células. La solución en este momento puede ser muy viscosa. En este momento se incuba por 25 minutos o 1 hora para completar la ruptura de las células, a 37° C.
7. PASO ADICIONAL: Agregar 1.5µl de RNAsa en solución (*Solution Rnase*) a la solución que contiene el lisado nuclear y mezcle por inversión del tubo 25 veces. Incube la mezcla a 37° C por 15 minutos. Enfíe la solución a temperatura ambiente antes de continuar.
8. Agregar 100µl de Amortiguador de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) al lisado nuclear y mezcle vigorosamente por 10-20 segundos.
9. Centrifugue a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente. Se observara un botón café oscuro.
10. Transfiera el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio de 1.5 ml el cual deberá contener 300µl de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Mezcle la solución por inversión del tubo hasta que se forme una masa blanca (ADN).
12. Centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. El ADN se hará visible como un botón blanco.
13. Decante el sobrenadante y agregue 300µl de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invierta el tubo varias veces para que el ADN se lave. Centrifugue por 1 minuto a máxima velocidad a temperatura ambiente.
14. Cuidadosamente aspire el etanol con una pipeta Pasteur. Invierta el tubo sobre un papel absorbente y seque al aire el Precipitado por 10-15 minutos.
15. Agregue 100µl de DNA Solución rehidratante (*Rehydration Solution*) (10mM Tris-HCl/1mM EDTA, pH 7.4) y rehidrate el ADN por incubación a 65° C por 1 hora. Periódicamente mezcle la solución por inversión del tubo. Alternativamente incube la solución toda la noche a temperatura ambiente.
16. Almacene el ADN de 2-8° C

### **Extracción de ADN de Manchas de Sangre. (Según el protocolo de ReadyAmp™ Purification System.)**

Antes de iniciar este protocolo, deberá calentarse un baño de agua a 56°C y otro a 100°C.

1. Transfiera 1ml de agua esterilizada libre de nucleasas a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5ml.
2. Agregar una pieza recortada de 9-25 mm<sup>2</sup> de la mancha hemática al tubo con agua.
3. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos a. Mezcle en *Vortex* la muestra cada 1-2 minutos durante la incubación.
4. Centrifugue la muestra a máxima velocidad (15,000 r.p.m.) por 2 minutos a temperatura ambiente en microcentrifuga.
5. Remueva y descargue el sobrenadante. Deje la pieza recortada dentro del tubo junto con el botón.
6. Agregue 200µl de resina (ReadyAmp™) al tubo que contiene la muestra.
7. Mezcle en *Vortex* la muestra para resuspender el botón completamente.
8. Incube la muestra por 20min en baño de agua a 56°C.
9. Mezcle en *Vortex* a alta velocidad por 5-10 segundos.
10. Incube la muestra por 8 minutos en un baño de agua a 100°C.
11. Mezcle en *Vortex* a alta velocidad por 5-10 segundos.
12. Centrifugue la muestra a máxima velocidad (15.000) por 2 minutos a temperatura ambiente.

**El ADN genómico purificado se encuentra en el sobrenadante.** La muestra de ADN puede almacenarse a 4°C o -20°C o puede emplearse directamente en la reacción de PCR. **Nota:** Generalmente es suficiente de 1-5µl de muestra como ADN patrón para 50µl de reacción de amplificación. El paso 13 deberá repetirse cada vez que se requiera tomar de esta muestra.

### **Extracción de ADN de Hueso**

1. Se toman 1.5mL de hueso previamente descalcificado y digerido con Proteinasa K.
2. Agregar 250µL de Solución amortiguadora de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) al hueso digerido y Mezcle en *Vortex* vigorosamente a alta velocidad por 20 seg.
3. Centrifugar por 20 minutos a máxima velocidad y baja temperatura. El precipitado de proteínas forma un botón blanco en el fondo del tubo.
4. Remueva cuidadosamente el sobrenadante (sin remover el botón), el cual, contiene el ADN y transferirlo a un tubo limpio de 1.5mL el cual deberá contener 500µL de Etanol absoluto Previamente enfriado.
5. Mezclar por inversión del tubo y congelar toda la noche a -4 grados centígrados.
6. Centrifugar a -4 grados por 30 minutos a máxima velocidad.
7. Remover el etanol por decantación (se puede reprecipitar el etanol para recuperar más ADN).
8. Evaporar el remanente de etanol.

9. Rehidratar el ADN con 180 $\mu$ L de agua estéril o con Solución rehidratante (*Reydration Solution*) por incubación a 65 grados centígrados por 2.5 horas, con inversión periódica (cada 15 min.), o incube la solución toda la noche a temperatura ambiente.
10. Agregar 3 $\mu$ L de solución de *RNAse* y mezcle por inversión del tubo 25 veces. Incube por 15 - 30 minutos a 37 grados. Deje reposar la solución por 5 min. antes de continuar.
11. Agregar 60 $\mu$ L de Resina (*ReadyAmp Resin*).
12. Mezcle en *Vortex* 3 segundos.
13. Incube la muestra por 20 min. a 56 grados.
14. Mezcle en *Vortex* a alta velocidad por 5-10 seg.
15. Incube la muestra 8 min. a 100 grados en baño de agua.
16. *Vortexear* a máxima velocidad de 5- 10 seg.
17. El ADN genómico obtenido de esta manera se encuentra purificado y libre de RNA. antes de hacer uso de este ADN se debe centrifugara máxima velocidad por 1 minuto sin tomar del fondo donde se encuentra la resina.

#### **Extracción de ADN a partir de líquido seminal.**

1. Colocar 3 $\mu$ l de líquido seminal en un tubo que contenga 200 $\mu$ l de chelex al 5%
  2. Adicionar 2 $\mu$ l de proteinasa K (10mg/mL) y 7 $\mu$ l de DTT 1M. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo.
  3. Incubar a 56°C por 30 a 60 minutos.
  4. Agitar vigorosamente por un tiempo de 5 a 10 segundos
  5. Centrifugar a 5000 rpm durante 3 minutos.
- Nota: Guardar en refrigeración de 2 a 8 °C antes del proceso de amplificación.

#### **Extracción de ADN en muestras de saliva**

1. Recolectar aproximadamente 1.5ml de saliva en un tubo estéril y adicionar el doble de su volumen de etanol absoluto.
2. Centrifugar a 2100rpm durante 5 minutos y decantar el sobrenadante
3. Adicionar 0.5ml de amortiguador de digestión, 12 $\mu$ l de proteinasa K (10mg/ml) y 15 $\mu$ l de DTT
4. Incubar las muestras a 56 grados durante 120 minutos y agitar cada 15 minutos vigorosamente.
5. Centrifugar a 2100rpm por espacio de 5 minutos.
6. Separar el sobrenadante teniendo cuidado de que no se mezcle con el sedimento y colocarlo en otro tubo estéril de 1.5 ml de capacidad.
7. Agregar un volumen igual de etanol frío.
8. Invertir el tubo varias veces y congelar por 5 minutos.
9. Centrifugar a 2100rpm durante 5 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante colocar el tubo boca abajo sobre una superficie absorbente, teniendo cuidado de no tirar el sedimento.
11. Adicionar 1ml de etanol al 70%
12. Centrifugar a 2100rpm durante 15 minutos.

13. Decantar y colocar la muestra en el hibridizador a 56 grados centígrados hasta que el etanol se evapore por completo.
14. Adicionar 200µl de TE pH 8.0
15. Dejar que la muestra se rehidrate toda la noche a 37°C.

### **Técnica de electroforesis horizontal con gel de agarosa para la Cuantificación del ADN.**

#### **Preparación del gel de agarosa:**

1. Disolver 0.8 g de agarosa en 100ml de solución TAE 1X y calentar la mezcla en horno de microondas por 3 minutos, para lograr la total disolución de la agarosa.
2. Preparar el molde para el gel y colocar el peine adecuado. Asegurarse que el molde quede en una superficie completamente plana (horizontal), a fin de que el grosor del gel sea uniforme.
3. Una vez disuelta la agarosa, vaciar en el molde evitando la formación de burbujas. enfriar a temperatura ambiente hasta su gelificación completa.
4. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar suficiente solución amortiguadora TAE 1X hasta cubrir el gel. Se retira entonces el peine con cuidado.

#### **Preparación de las muestras.**

1. Sobre una placa de microtitulación, colocar 3µl de azul de bromofenol y 7µl de ADN genómico. Mezclar.
2. Depositar la mezcla tomándola con micropipeta, la punta deberá mantenerse en forma vertical cuando se este colocando la muestra dentro del pozo en el gel. Vaciar tratando de no introducir aire y de no perforar el gel.
3. Colocar los estándares de ADN de 5, 10,50, 100 y 200 ng.

#### **Migración**

1. Una vez que se han colocado las muestras, conectar la cámara a la fuente de poder e iniciar con el corrimiento electroforético a 100 volts.
2. La electroforesis se detiene una vez que el colorante de azul de bromofenol llegue 2 cm antes de la parte terminal del gel.
3. Se desconecta la cámara y se saca el gel para teñirlo.

#### **Tinción**

1. El gel se coloca en una solución de bromuro de etidio (2µg /µl ) durante 5 minutos con agitación orbital a 50rpm. se saca y se enjuaga con agua corriente para quitar el exceso de bromuro.
2. Observar en Eagle Eye.
3. Sacar impresión fotográfica.

La cuantificación del ADN en cada una de las muestras se realiza por comparación visual de las bandas observadas de las muestras con la de los estándares de concentración conocida.

**Preparación de gel de producto para la identificación de productos de amplificación para la identificación de sexo.**

1. Se realiza lo mismo que para el gel de agarosa pero se ocupan **2.7gr de agarosa grado electroforético en 100ml de TAE 1X** (gel al 2.7%).
2. En una placa de microtitulación se deposita  $1\mu\text{l}$  de azul de bromofenol dependiendo del número de muestras que se requieran correr. Se toman  $8\text{-}10\mu\text{l}$  de las muestras de ADN amplificado y se mezclan con el colorante.
3. Se mezcla perfectamente y se depositan en los pozos del gel dejando el primer pozo sin ocupar y en el segundo se colocan  $3\mu\text{l}$  del marcador de peso molecular (MPM) de 100 pares de bases.
4. Una vez que se depositaron las muestras correspondientes al cromosoma X inmediatamente después en el pozo siguiente se colocan  $3\mu\text{l}$  del marcador de peso molecular de 50 pares de bases y se realiza lo mismo en los pozos siguientes pero ahora para las muestras del cromosoma Y.
5. Una vez que se cargaron todas las muestras se coloca en el pozo inmediato otros  $3\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular de 100p.
6. Se conecta la cámara a la fuente de poder y se inicia el corrimiento electroforético a 250-300Volts iniciales por 2-3 minutos.
7. Pasado este tiempo, se disminuye el voltaje a 110 volts y así se deja correr por espacio de 70minutos.
8. Transcurrido ese tiempo se desconecta la cámara y se tiñe el gel en solución de bromuro de etidio ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), por 10 minutos.
9. Se observa en Transiluminador de Luz UV (Eagle-Eye) y se toman impresiones fotográficas.
10. Para individuos femeninos se identifica en el gel la presencia de una banda única de 130pb en las muestras del cromosoma X y ninguna para esa misma muestra en el cromosoma Y.
11. Para el caso de un individuo masculino se identifica una banda de 130 pb en las muestras del cromosoma X y una banda de 170 pb para el cromosoma Y

## APENDICE C

### PREPARACIÓN DE REACCIÓN DE PCR.

**Preparación de la mezcla de reacción para la determinación de sexo genético.**

| N# de muestras    | ADN      | Agua estéril | Sol'n Amortiguadora. | dNTP's   | Cebadores X1, X2 Y1, Y2 | MgCl <sub>2</sub> | BSA      | Taq Pol  |
|-------------------|----------|--------------|----------------------|----------|-------------------------|-------------------|----------|----------|
| Control Masculino | 2µl      | 23.5µl       | 5µl                  | 10µl     | 0.5µl C/U               | 2µl               | 8µl      | 2µl      |
| Control Femenino  | 2µl      | 23.5µl       | 5µl                  | 10µl     | 0.5µl C/U               | 2µl               | 8µl      | 2µl      |
| Muestra 1         | 2µl      | 23.5µl       | 5µl                  | 10µl     | 0.5µl C/U               | 2µl               | 8µl      | 2µl      |
| Muestra 2         | 2µl      | 23.5µl       | 5µl                  | 10µl     | 0.5µl C/U               | 2µl               | 8µl      | 2µl      |
| ...X 3            | 2µl      | 23.5µl       | 5µl                  | 10µl     | 0.5µl C/U               | 2µl               | 8µl      | 2µl      |
| Blanco            | -----    | 23.5µl       | 5µl                  | 10µl     | 0.5µl C/U               | 2µl               | 8µl      | 2µl      |
| <b>TOTAL</b>      | <b>A</b> | <b>B</b>     | <b>C</b>             | <b>D</b> | <b>E</b>                | <b>F</b>          | <b>G</b> | <b>H</b> |

#### **MODO DE PREPARACIÓN**

Se sigue el orden descrito en la Tabla para cada uno de los oligonucleótidos cebadores (X1, X2, Y1, Y2), por lo tanto, se preparan dos mezclas de reacción diferentes una para cada par de cebadores.

1. Se preparan los tubos dependiendo del número de muestras más los controles masculino y femenino y el blanco. Para cada muestra se marcan dos tubos, uno como X y el número que le corresponda y otro con Y con el mismo número.
2. Se prepara en dos tubos aparte (marcados como mezcla maestra X y mezcla maestra Y), la mezcla de reacción para cada uno de los cebadores.
3. Para cada uno de las mezclas maestras se agrega el total de los componentes calculado para el número total de muestras.
4. Se agrega en los tubos de reacción 2µl de ADN problema (si el rendimiento de la extracción es semejante al obtenido en sangre se puede hacer una dilución 1:25 y tomar 2µl, opcional).

5. Se calcula el contenido total de la mezcla maestra y se divide entre el número de muestras y el resultado es el volumen de muestra de reacción que se dispensará en cada tubo de reacción que tiene ya el ADN dispensado en el fondo.
6. Es importante seguir el orden de preparación de la mezcla maestra como sigue: Agua, solución amortiguadora, dNTP's, cebadores, cloruro de magnesio, BSA y Taq ADN polimerasa, manteniendo siempre la mezcla en baño de hielo.
7. Se amplifican las muestras en el termociclador 9600 de Perkin-Elmer, programa 11.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

*Azul de bromofenol.* Disolver 0.1g de azul de bromofenol en 23.7 ml de agua desionizada. Agregar 1 ml de Tris-HCl 1M (pH 8), 0.3 ml de EDTA 0.5 M y 25 ml de glicerol. Mezclar.

*Bromuro de etidio (0.5mg/ml).* Disolver 50mg de bromuro de etidio en 80 ml de agua ultrapura. Aforar a 100ml y almacenar en un recipiente de vidrio ámbar a 4°C. De esta solución hacer una dilución 1:1000 con agua desionizada y con esta se tiñen los geles.

*Solución amortiguadora TAE 50X.* Disolver 242.2 g de tris base en 400ml de agua ultrapura, adicionar 200ml de EDTA 0.5M y 57.1 ml de ácido acético glacial. Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 1 litro.

*Solución amortiguadora TAE 1X.* Hacer una dilución 1:50 de la solución anterior con agua desionizada.

*Ditiotreitol (DTT).* Disolver 15.45 g de Ditiotreitol en 100 ml de agua deionizada. Almacenar a -20°C.

*Proteinasa K. (5mg/ml).* Disolver 100mg de proteinasa K en 20 ml de agua desionizada. Almacenar la solución en alícuotas de 500µl en tubos de microcentrifuga a -20°C.

## Preparación de los oligonucleótidos cebadores X1, X2, Y1, Y2.

Los pares de oligonucleótidos empleados, se reconstituyeron con agua estéril libre de ARNasa y DNasa, sin embargo, la cantidad de esta agua depende de la concentración final a la que usaríamos los cebadores en la mezcla de reacción para lo cual se empleó la fórmula siguiente:

$$A_{260} \text{ Total} / (\text{EM}) \times (\text{concentración Molar Requerida}) = \text{mL de Agua}$$

Donde:

**$A_{260}$  Total = Absorbancia del cebador a 260 nm\***

**EM = Coeficiente de Extinción**

**Y se calcula:**

$$\text{EM} = \# \text{A's ( 16000 )} + \# \text{G's ( 12000 )} + \# \text{C's ( 7000 )} + \# \text{T's ( 9600 )}$$

**Donde:**

**# A's = Numero de adeninas en la secuencia del cebador**

**# G's = Numero de guaninas en la secuencia del cebador**

**# C's = Numero de citocinas en la secuencia del cebador**

**# T's = Numero de timinas en la secuencia del cebador**

**La concentración molar que requerimos para este trabajo es de:  $1 \times 10^{-4} \text{ M} = 100 \text{ mM}$**

Esta operación se realiza para cada uno de los componentes del par de oligonucleótidos cebadores (X1, X2, Y1, Y2.), la absorbancia total de cada uno de los cebadores, es proporcionada por el fabricante o casa comercial que sintetizó los cebadores



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Bangham. R. M. (1991).** The Polymerase Chain Reaction Protocols in Human Molecular Genetics In : "Methods in Molecular Biology" Edit by Christopher G. Mathew. Human Press.
2. **Erlich. H. A.(1989):** PCR Technology, in Principles and Applications for DNA Amplification. New York.
3. **Gallatis.T. Liechtt.:**Sex determination of forensic samples by simultaneous PCR amplification of alpha-satellite DNA from both the X and Y chromosomes. *J. Forensic Sc*1995.40, : 239-241.
4. **Innis M. A., Gelfand D. H. , Sninsky J. J. And cols;(1990) :**PCR Protocols a Guide to Methods and Applications; Academic Press inc, USA; :325-336
5. **Kobilinsky. L. (1990).** : Deoxiribonucleic Acid Structure and Function a Review; Jhon Jay College of Criminal Justice City University of New York;: 287 350.
6. **M. Witt. and R. .P. Erickson:** A rapid Method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the Polymerase Chain Reaction; *Human Genetics.* (1989), 82, : 271-274.
7. **Mullis. K. B., and Faloona. F. A.:** Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase Catalized Chain Reaction. *Methods Enzimol.*155.(1985);: 335-350.
8. **Pääbo.S. (1990).** Amplifying Ancient DNA. *PCR Protocols.:* A Ovide to Methods and Application. :159-160
9. **Saavedra. C. G. (1996).**: Análisis de la distribución de las frecuencias Alelicas y Genotípicas en el Locus DIS80 en una Muestra de la zona Metropolitana de la ciudad de México. Tesis de Licenciatura UNAM

10. Saiki R. (1990).: Technology Principles and applications for DNA Amplification; Erlich H. Ed.; Stockton Press. New York: 7-16.
11. Saiki. R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.
12. Saiki. R.K., Scharf, S., Faloona, F., et al. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$  - globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354.
13. Salazar. C. M. Z.. (1995).: Estudios Moleculares en Poblaciones Mexicanas prehispanicas y Actuales. Tesis de Licenciatura UNAM.
14. Sambrook. J; E. F. Fritsch. E. F.; T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press.: 14.1-15.0
15. Sensabaugh.: F. F. G. (1990). :DNA Analysis in Biological Evidence ; Applications of the Polymerase Chain Reaction; Forensics Science Group School of public Health, University of California.: 415-450.
16. Wolf. U.; Schempp. W.; and Gerd. S. (1992) "Molecular Biology of the Human Y Chromosome in: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. Vol.121. Springer-Verlag.: 147-213.
17. Y-M. LO. P. Patel., K. A. Fleming 1989.: Prenatal Sex Determination by DNA Amplification from Maternal Peripheal Blood in: The Lancet December 9:1363-1366.

18. Akane, A., Shiono, H., Matsubara, K., Nakamura, Kagawa, M., (1993). Purification of Forensics Especimens for the Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis.. J. Forensic Sci. 38:691-701
19. Mannucci, A., Sullivan, M.N., Ivanov, Pl., Gill, P., (1994). Forensics application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenine. Int. J. Legal. Med. 106:190-193
20. Takeuchi, T., (1993). Nippon Hoigaku Zasshi. 47:239-249
21. Naito, E., Dewa, K., Yamanouchi, H., Kominami, R., (1994). Sex tipping of forensic DNA samples using males-and female-especific probes. J. Forensic Sci. 39: 1009-1017.
22. Neeser, D., Liechti-Gallati, S., (1995). Sex determination of forensic samples by simultaneous PCR amplification of Alpha-Satellite DNA from the both the X and Y Chromosomes. J. Forensic Sci. 40:239-241
23. Kreike, J., Lehner, A., (1995). Sex determination and DNA competition in the analysis of forensic mixed stains by PCR. Int. J. Legal Med. 107: 235-238
24. Sasaki, M., Shimizu, K., Fukushima. T., Shiono, H., (1995). Analysis of sex Chromosomal DNA markers by a molecular biological method and it's application to forensic medicine. Nippon Hoigaku Zasshi. 49: 70-79
25. Findlay, I. , Urquhart, A., Quirke, P., Sullivan, K., Rutherford, A., (1995). Simultaneous DNA "fingerprinting", diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. Hum Reprod. 10: 1005-1013
26. Kawano, S., Tsukamoto, T., Ohtaguro, H., Tsutsumi, H., Takahashi, T., Miura, I., Mukoyama, R., (1995). Sex determination from dental calculus by polymerase chain reaction (PCR). Nippon Hoigaku Zasshi. 49: 193-198

27. Falsetti, A., (1995). Sex assessment from metacarpals of the human hand. *J. Forensics Sci.* 40: 774-776.
28. Finch, J., Hope, R., Daal, A., (1996). Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Sci Justice* 36: 93-95
29. Stacks, B., Witte, M., (1996). Sex determination of dried blood stains using the polymerase chain reaction (PCR) with homologous X-Y primers of the zinc finger protein gene. *J. Forensic Sci.* 41: 287-290
30. Shiono, H., (1996). Personal identification using DNA polymorphism- the identification of forensic biological materials *Nippon Hoigaku Zasshi* 50: 320-330
31. Hanaoka, Y., Minaguchi, K., (1996). Sex determination from blood and teeth by PCR amplification of the alphoid satellite family. *J. Forensic Sci* 41: 855-858
32. Ribot, E. M, Quinn, D. F., Bai, X. (1998). Comparative PCR: An Improved Method to Detect Gene Amplification. *BioTechniques* 24 (6): 22-26
33. Siebert, P. D. And J. W. Larrick., (1992). *Competitive PCR. Nature* 359: 557-558
34. Willems, H.,; Adaptor PCR for the Specific Amplification of Unknow DNA Fragments.(1998).*BioTechniques* 24: 26-28
35. Arnold, C. And Hodgson, I. J. (1991). Vectorette PCR: a novel approach to genomic Walking. *PCR Methods Appl.* 1: 39-42.
36. Westfall, B., Sitaraman, K., Solus, J., Rashtchian, A., (1997): Improved PCR Specificity and Yield With Platinum Taq DNA Polymerase., *Focus* 19(3): 46-48.
37. Li, H., Cui, X., and Arnheim, N., (1990). *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 87:80-88.
38. Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R., (1998);*pro. Natl. Acad. Sci. USA* 85:89-98.

39. Chou, Q., Russel, M., Birch, D., Raymond, J., and Bloch, W. (1992). *Nucleic Acid Res* 20:1717.
40. D' Aquila, R. T., Bechtel, L. J., Videler, J.A., Eron, J. J., Gorczyca, P., and Kaplan, J. C. (1991). *Nucleic Acid Res*. 19: 3749
41. Sharkey, D. J., Scalice, E., Christy, K., Atwood, S. M., and Daiss, J. L.. (1994). *BioTechnology* 12: 506
42. Daiss, J. L., Scalice, E., and Sharkey, D. J., (1995). *J. Immun. Meth*. 183:15
43. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., (1990). PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press.
44. Cobb, B., Clarkson, J., (1994). A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*. 18:3801-3805
45. Nathan, M., Fox, K. D., (1996). Acetylated BSA Increase the Sensitivity of RT-PCR whit Low Levels of RNA. (1997). *Focus* 19(3):50-51.
46. Forbes, B. A., and Hicks, K. E., (1996): Sustances Interfering whit Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens by PCR: Effects of Bovine Serum Albumin. *J. Clin. Microbiol.* 34(9):2125-2127.
47. Akane, A., Matsubara, K., Nakamura, H., Takahashi, S., and Kimura, K., (1994), Identification of the Heme Compound Copurified whit deoxyribonucleic acid (DNA) from Bloodstain , a major Inhibir of Polymerase Chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic. Sci.* 2:362-372
48. Dutton, M. D., Varhol, R.j., And Dixon, G. D.,(1995): Technical Considerations for the Use of the Ethidium Bromide in the Quantitative Analysis of Nucleic Acid. *Anal Biochem.* 230: 353-355.

49. Vandamme, A. M., Fransen, K., Debaisieux, L., Marissens, D., Sprecher, S., Vaira, D., and the Belgian AIDS Reference Laboratories. (1995) *J. Virol. Meth* 51: 305-316.
50. Cross, N: C.(1995), Quantitative PCR Techniques and Applications. *British. J. Of Haematology* 89:693-697.
51. Wahlfors, J., Meurman, J. H., Toskala, J., Korhonen, A., Alakuijala, P., Janatuinen, E., (1995): Development of a Rapid PCR Method for Identification of *Helicobacter pylori* in Dental Plaque and Gastric Biopsy Specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14:780-786.
52. Vinogradskaya, G. R., Goryshin, I. Yu., Bertin, Yu. A., Lanzou, V.A.,(1995): Optimization of PCR-Based Diagnostic for Human Cytomegalovirus. *J. Of Virol Meth* 53:103-112.
53. Murray, V., and Monchawin, Ch., (1994): A Polymerase Chain Reaction on Human Alphoid DNA produce a Characteristic Ladder of Bandas. *Biochem and Mol Bio. Int.* 43(2):323-327
54. Maher, M., Glennon, M., Martinazzo, G., Turchetti, E., Marcolini, S.,(1996) Evaluation of a novel PCR-Based Diagnostic Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum Samples., *J. of Clin Microbiology.* 34(9):2307-2308.
55. Liou, J.D., Hsieh, T'-T', Pao, C., (1997). Presence of cell of Fetal Origin in Maternal Circulation of Pregnant Women. *Ann. N.Y. Ac. Of Sci.* 237-241
56. Kao, S. M., Tang, G. C., Hsieh, Young, Wang, and Pao, (1992): Analysis of Peripheal Blood of Pregnant Women for the Presence of Fetal Y-Chromosome Specific ZFY gene deoxyribonucleic Acid sequences. *Am. J. Obst. Gynecol* 166: 1013-1019

57. Pau, C. C., Kao, Hor, and Chang. (1993). Lack of mutational alteration in the conserved Region of ZFY and SRY genes of 46, XY female whit gonodal dysgenesis. *Hum Reprod.* 8:224-228.